

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



**EFFECTOS CORIORRETINIANOS TRAS LA
APLICACIÓN DEL LÁSER DE DIODO Y SU
EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

M^a de las Viñas Andrés Simón

Bajo la dirección de los doctores
José Manuel Ramírez Esteban y Alberto Triviño Casado

Madrid, 2009

• ISBN: 978-84-692-5055-6

TESIS DOCTORAL

EFECTOS CORIORRETINIANOS TRAS LA
APLICACIÓN DEL LÁSER DE DIODO Y SU
EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO

M^a de las Viñas Andrés Simón

2008

***“El problema no está en ver lo que nadie vio,
sino en pensar lo que nadie pensó
sobre lo que todo el mundo puede ver”***

Schopenhauer

A Jaime y a mis tres hijos
Pablo, Santiago y Juan

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Prof. D. Julián García Sánchez por haberme permitido incorporarme al Instituto de Investigaciones Oftalmológicas “Ramón Castroviejo”, donde este trabajo se ha llevado a cabo, así como atender a mis progresos durante todo el desarrollo del estudio.

Quiero también agradecer sinceramente al Prof. D. José Manuel Ramírez Sebastián y al Prof. D. Alberto Triviño Casado, sus enseñanzas y su dirección para conseguir que este trabajo se haya finalizado.

Un agradecimiento especial es para el Prof. D. Juan José Salazar Corral y la Prof. Dña. Ana Isabel Ramírez Sebastián por su dedicación y ayuda, sin la cual, este estudio no hubiera podido realizarse.

Igualmente quiero dar las gracias al Prof. D. Benjamín Fernández y la Prof. M^a Teresa Solás por ser los responsables de mi pasión por la biología, histología y organografía celular microscópica.

Me gustaría también dar mi agradecimiento al resto de mis compañeros del Instituto Castroviejo que me prestaron su ayuda desinteresada, e especialmente a Rosa, Belén, Charo, Silvia, Julián, Shafik y Nabil, con un especial y cariñoso recuerdo dirigido a Carmen, que seguro que estará muy orgullosa de mí.

Quiero dar las gracias a todas las personas que durante el largo desarrollo de este trabajo se han interesado por él y me han infundido ánimo y confianza para llevarlo a su fin; entre todos ellos a mis amigos del barrio (Juanjo, Pablo, Ignacio y Cristina), mis queridos amigos de Cruz Roja Juventud (Rafa, Miguel, Eva y Cristina), mis especiales amigos de la facultad (Marian, César, Gema, Belén y Arancha), mis excompañeros de Cibest, de Phidea, mis actuales compañeros de Neuropharma (Belén, Joan, Nicolás e Isolde), a Marita y M^a Eugenia que siempre confiaron en mí y a mi querida Isabel, atenta siempre a mi necesidad de tiempo.

Especialmente quiero agradecer la confianza y el apoyo recibido por mi familia, especialmente mis padres, hermanos, cuñados y sobrinos, pero también a mis tíos, padrinos y primos, en especial Esther que siempre se han interesado por mis progresos.

Mi cariñoso agradecimiento al Dr. Teodoro del Ser Quijano que me ha asesorado y facilitado con sus educados e interesantes comentarios y sugerencias, que finalmente se pudiera culminar esta tesis.

Una mención muy especial es para Jaime que compartió la alegría de mis avances y me animó en mis decepciones; así como el empuje que me ha infundido ver crecer a mis hijos Pablo, Santiago y Juan.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.- FUENTES ARTIFICIALES DE RADIACIÓN LUMINOSA SOBRE EL FONDO OCULAR	1
1.1.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
1.1.2.- EL LASER	3
1.1.2.1.- Principios básicos de la radiación láser	3
1.1.2.2.- Características de la radiación láser	3
1.1.2.3.- Tipos de láseres	5
1.1.2.3.1.- Clasificación según el medio activo	5
1.1.2.3.2.- Clasificación según los diferentes sistemas de bombeo	5
1.1.2.3.3.- Clasificación según la configuración del pulso	6
1.1.2.4.- El láser de diodo	6
1.1.2.4.1.- Introducción histórica a los láseres semiconductores sólidos	6
1.1.2.4.2.- Características del aparato y principios básicos de su funcionamiento	7
1.1.3.- FENÓMENOS FÍSICOS PRODUCIDOS POR LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA SOBRE LOS MEDIOS OCULARES	9
1.1.3.1.- Estudios de transmisión de los medios oculares transparentes	9
1.1.3.2.- Estudios de absorción en los sistemas pigmentados	11
1.1.3.2.1.- La melanina en las células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) y los melanocitos coroides	11
1.1.3.4.2.- La hemoglobina sanguínea en los vasos retinianos y coroides	12
1.1.3.4.3.- La xantofila en el área macular	13
1.1.4.- EFECTOS DE LA RADIACIÓN SOBRE LOS TEJIDOS OCULARES	13
1.1.4.1.- Factores que determinan una lesión por radiación láser	14
1.1.4.1.1.- La longitud de la onda emisora	14
1.1.4.1.2.- La potencia	14
1.1.4.1.3.- Duración de la emisión	15
1.1.4.1.4.- Tamaño y forma de la imagen	15
1.1.4.2.- Tipos de efectos tisulares	16
1.1.4.2.1.- Efecto térmico	16
1.1.4.2.2.- Efecto fotoquímico	19
1.1.4.2.3.- Efecto eléctrico	19
1.1.4.2.4.- Efecto mecánico	20
1.1.5.- HISTOPATOLOGIA DE LAS LESIONES OCULARES PRODUCIDAS POR RADIACIONES EMITIDAS POR EL LÁSER DE DIODO	20
1.1.5.1.- Características de la radiación emitida por el láser de diodo	20
1.1.5.2.- Estudios oculares histopatológicos de las lesiones producidas por la fotocoagulación con el láser de diodo	21
1.1.5.2.1.- El conejo como animal de experimentación	21
1.1.5.2.2.- Estudios en primates no humanos	25
1.1.5.2.3.- Estudios en humanos	25
1.2.- LA GLIA RETINIANA	26
1.2.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL A LA GLÍA DEL SISTEMA NERVIOSO	26
1.2.2.- LA MACROGLÍA DE LA RETINA	28
1.2.2.1.- Primeras descripciones. Las impregnaciones argentícas y sus modificaciones	29
1.2.2.2.- Estudios inmunohistoquímicos	31
1.2.2.2.1.- Generalidades sobre la técnica de inmunomarcaje	31
1.2.2.2.2.- Marcadores específicos	32
1.2.2.2.3.- Estudios inmunohistoquímicos de la morfología y distribución de la macroglía retiniana	34
1.2.2.3.- Estudios ultraestructurales	37
1.2.2.4.- Funciones de la macroglía	38
1.2.2.4.1.- Sostén del tejido nervioso	38
1.2.2.4.2.- Modulación del metabolismo y actividad neuronal	39
1.2.2.4.3.- Participación en el desarrollo y crecimiento del tejido nervioso	42
1.2.2.4.4.- Formación de la barrera hemato-encefálica y hemato-retiniana	43
1.2.2.4.5.- Participación en los procesos patológicos del Sistema Nervioso	44
1.2.3.- LA MICROGLÍA DE LA RETINA	46
1.2.3.1.- Primeras descripciones. Las impregnaciones argentícas y sus modificaciones	46
1.2.3.2.- Las técnicas de inmunomarcaje	48
1.2.3.3.- Morfología general de la microglía del SNC	51
1.2.3.4.- Funciones de la microglía	53
1.2.3.4.1.- Fagocítica y reparadora frente al daño neuronal	53
1.2.3.4.2.- Moldeadora en la histogénesis durante el desarrollo	57
1.2.3.4.3.- Reguladora de fluidos	59

1.2.3.4.4.- Otras funciones.....	59
1.2.3.5.- La morfología y distribución de la microglía de la retina.....	59
1.2.4.- IMPLICACIÓN DE LA GLÍA EN TEJIDOS VISUALES PATOLÓGICOS.....	62
1.2.4.1.- Respuesta macroglial.....	62
1.2.4.1.1.- Cambios en la inmunorreactividad de la macroglía.....	62
1.2.4.1.2.- Formación de la cicatriz glial.....	64
1.2.4.3.- Respuesta microglial.....	66
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	73
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1.- CARACTERÍSTICAS DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	75
3.2.- APLICACIÓN DEL LÁSER DE DIODO	75
3.3.- GRUPOS DE ANIMALES.....	77
3.4.- FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES	77
3.5.- OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	78
3.6.- TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	79
3.7.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	80
3.7.1.- MARCAJE DE CÉLULAS ASTROGLIALES CON ANTI-PGFA (PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA).....	80
3.7.2.- MARCAJE DE CÉLULAS MICROGLIALES CON LECTINAS DE TOMATE.....	81
3.8.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES A MICROSCOPIA ÓPTICA.....	82
4.- RESULTADOS	83
4.1.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 3 DÍAS	83
4.1.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.....	83
4.1.1.1.- Zona central: (Fig. 2 y 3).....	84
4.1.1.2.- Zona intermedia: (Fig. 4).....	84
4.1.1.3.- Zona periférica de la lesión (Fig. 5).....	85
4.1.1.4.- Radios Medulares (Fig. 6 y 7)	89
4.1.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....	90
4.1.2.1.- PGFA (Fig. 8, 9 y 10).....	90
4.1.2.2.- Lectinas (Figs. 14 y 15).....	94
4.2.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 7 DÍAS	96
4.2.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.....	96
4.2.1.1.- Zona central (Fig. 16).....	96
4.2.1.2.- Zona periférica (Fig. 18).....	98
4.2.1.3.- Radios Medulares (Fig. 19).....	99
4.2.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	100
4.2.2.1.- PGFA (Fig. 20).....	100
4.2.2.2.- Lectinas (Fig. 23).....	102
4.3.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 15 DÍAS	105
4.3.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.....	105
4.3.1.1.- Zona central (Fig. 27).....	105
4.3.1.2.- Zona periférica (Fig. 28).....	105
4.3.1.3.- Radios Medulares (Fig. 29).....	107
4.3.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	108
4.3.2.1.- PGFA (Fig. 30).....	108
4.3.2.2.- Lectinas (Fig. 32 y 33).....	108
4.4.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 1 MES	111
4.4.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.....	111
4.4.1.1.- Zona central (Fig. 34).....	111
4.4.1.2.- Zona periférica (Fig. 35).....	112
4.4.1.3.- Radios Medulares (Fig. 36).....	114
4.4.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	114
4.4.2.1.- PGFA (Fig. 37).....	114
4.4.2.2.- Lectinas (Fig. 39 y 40).....	115
4.5.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 2 MESES.....	118
4.5.1.- HEMATOXILINA-EOSINA.....	118
4.5.1.2.- Zona central (Fig. 41).....	118
4.5.1.3.- Zona periférica (Fig. 42).....	118
4.5.1.3.- Radios Medulares (Fig. 43).....	120
4.5.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	121
4.5.2.1.- PGFA (Fig. 44 y 45).....	121
4.5.2.2.- Lectinas (Fig. 47 y 48).....	122

5.- DISCUSIÓN	125
5.1.- GENERALIDADES SOBRE LA RADIACIÓN LÁSER	125
5.2.- GENERALIDADES SOBRE EL TEJIDO DIANA	125
5.2.1.- EL LÁSER DE DIODO Y LOS PIGMENTOS OCULARES	126
5.2.2.- CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	128
5.3.- USO TERAPÉUTICO DE LA FOTOCOAGULACIÓN CON LÁSER DE DIODO	129
5.3.1. VENTAJAS Y POSIBILIDADES	129
5.3.2.- DESVENTAJAS E INCONVENIENTES.....	130
5.4.- LOS TIEMPOS DE OBSERVACIÓN Y TINCIONES UTILIZADAS	132
5.5.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A CORTO PLAZO (3 DÍAS)	134
5.5.1.- HEMATOXILINA EOSINA.....	134
5.5.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	141
5.6.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A MEDIO PLAZO (7 Y 15 DÍAS)	145
5.6.1.- HEMATOXILINA EOSINA.....	145
5.6.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	147
5.7.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A LARGO PLAZO (1 Y 2 MESES)	149
5.7.1.- HEMATOXILINA EOSINA.....	149
5.7.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA	151
5.8.- VISIÓN GENERAL DE LA EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN	152
6.- CONCLUSIONES	157
7.- BIBLIOGRAFÍA	158

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	anhidrasa carbónica
ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
BHR	barrera hemato-retiniana
C	banda de conducción
CC	Coriocapilar
CCG	Capa de células ganglionares
CFNO	Capa de fibras del nervio óptico
CLED	diodos emisores de luz coherente
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CW	onda continua (continuous wave)
DAB	3'3'-diaminobencidina tetrahidroclórico
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
E	Energía
EPR	epitelio pigmentario de la retina
GaAlAs	Galio-Aluminio-Arsénico
GABA	ácido gamma amino-butírico
h	constante de Plank
I-B4 GSA	isoelectina B4 de la semilla de Griffonia simplicifolia
LÁSER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LCR-1	lipocortina 1
LED	diodos emisores de luz (light emitter diode)
MASER	Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MB	membrana de Bruch
MEC	matriz extracelular
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MHC	complejo de histocompatibilidad mayor
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
MO	Microscopía óptica
ND:YAG	Neodimium: Itrio, Aluminio, Galio
NDPasa	nucleósido difosfatasa
NO	nervio óptico
PAP	peroxidada antiperoxidasa
PBS	Tampón fosfato salino
PGFA	proteína gliofibrilar ácida
PNA	aglutinina de cacahuete
PNPasa	fosforilasa de nucleósidos de purina
PPTTasa	pirofosfatasa de tiamina
PW	onda pulsante (pulsed wave)
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nerviosos periférico
TOM	Transmitancia del medio ocular
TPPasa	Pirofosfatasa de tiamina
V	banda de valencia
WGA	aglutinina de germen de trigo
γ	frecuencia de la onda electromagnética
λ	longitud de onda

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- FUENTES ARTIFICIALES DE RADIACIÓN LUMINOSA SOBRE EL FONDO OCULAR

1.1.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La especie humana, por un simple mecanismo de conservación, ha evitado desde siempre la exposición a fuentes luminosas intensas. Podemos mencionar a Sócrates (469-399 a. C) quien predijo los efectos perjudiciales de la luz solar sobre los ojos, recomendando no mirar directamente al sol durante los eclipses solares (L'ESPERANCE, 1989a). La primera demostración de esta anticipación la hizo Teophilus Bonetus, en el siglo XVII, que describió por primera vez un escotoma producido por la quemadura debida a una exposición solar (L'ESPERANCE, 1989a).

Estas observaciones fueron objeto de los primeros estudios experimentales en el siglo XIX, cuando Czerny y Deutschmann, en 1867 y 1882 respectivamente, observaron las quemaduras retinianas en conejos con sus pupilas previamente dilatadas, expuestos a la luz solar. Ya en el siglo XX, concretamente en 1943, Eccles y Finn calcularon en un minuto, el tiempo mínimo de exposición solar directa necesario para producir una quemadura ocular (CAMPBELL, 1963).

Es necesario mencionar especialmente los trabajos del español Morón-Salas (1945-46), quien fue pionero en la ejecución de fotocoagulaciones experimentales con luz solar en conejos y en humanos entre 1945 y 1946. Morón-Salas trataba terapéuticamente los desprendimientos de retina de sus pacientes, enfocando la luz solar con una lupa en sus fondos oculares, y posteriormente observaba los efectos provocados por esta fotocoagulación mediante un oftalmoscopio (MORÓN-SALAS, 1950). Los trabajos de Meyer-Schwicherath (CAMPBELL, 1963) se hicieron por las mismas fechas y con metodología similar.

Teniendo en cuenta que la energía que va asociada a una onda depende de su longitud, y la energía absorbida o transmitida por una superficie depende de las características propias de la misma, resulta necesario conocer al máximo las características de absorción y transmisión de las diferentes estructuras oculares (córnea, cristalino, humor vítreo y acuoso...) dependiendo de la longitud de onda emisora (SMITH, 1968; SOLON, 1961) para poder inferir el efecto. Por ello, a finales del siglo XIX y durante todo el siglo XX, la mayoría de los trabajos se centraron en estos aspectos.

Desgraciadamente, tras la explosión atómica de Hiroshima y Nagasaki, el postulado de Verhoeff y Bell en 1916 (VERHOEFF, 1916), según el cual la iluminación artificial podía resultar peligrosa por la radiación térmica que se originaba en la retina, resultó confirmada (GUERRY III 1956, 1958, 1960), Fueron Buettner y Rose (HAM 1958), los primeros en resaltar la vulnerabilidad del ojo expuesto en las explosiones nucleares. Este hecho desencadenó numerosos estudios clínicos en personas afectadas por dichas explosiones y fue la base para la realización de estudios experimentales con simulaciones en animales. En este sentido, son de destacar los trabajos de

Byrnes (BYRNES, 1956), quien expuso conejos a explosiones simuladas con una lámpara de carbono. Con este trabajo demostró que el calor de la explosión, era capaz de producir lesiones retinianas similares a las obtenidas por una exposición directa a la radiación solar. Sin embargo, su utilización terapéutica no era posible ya que la vida media de la lámpara de carbono era muy corta y el control de la emisión muy dificultoso (CAMPBELL, 1963; ROSE, 1966).

A partir de este momento, el objetivo de los trabajos se amplió al estudio de las relaciones entre la dosis de radiación y el tamaño de la lesión retiniana (GUERRY, 1956) y la evolución de la lesión retiniana con el transcurso del tiempo (CAMPBELL, 1963; GUERRY, 1956; HAM, 1958; KISSEN 1961).

Otra línea de trabajo que se desarrolló de forma paralela, comenzó a partir de los años 50, cuando se establecieron los principios del oscilador MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), cuyos conocimientos fueron aprovechados por Maiman en 1960 (L'ESPERANCE, 1968) para desarrollar el máser óptico o láser, utilizando en un primer momento como fuente de radiación, un cristal de rubí. El desarrollo de esta tecnología permitió, por primera vez, crear un rayo con una gran cromaticidad y coherencia; es decir, se podía enfocar de un modo muy preciso y se conseguía una alta densidad de energía por fotón liberado, todo ello dentro de la región visible del espectro de radiación (CAMPBELL, 1963; ZARET, 1961), acuñándose el término de *LÁSER* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*).

La conjunción de estas características técnicas con los avances en el conocimiento de la absorción y transmisión de la energía por las diferentes estructuras oculares, hacen del láser un instrumento de una gran utilidad oftalmológica por su uso potencial como fotocoagulador, demostrable por los posteriores y numerosos trabajos experimentales y clínicos que se realizaron en esta área.

A partir de este momento, la investigación se desarrolló en dos sentidos diferentes: Por una parte, en la ingeniería física para el desarrollo de aparatos de nuevas fuentes de radiación, más eficaces, rentables y versátiles, y por otra; en la medicina y biología para el estudio histopatológico de la lesión generada en el fondo ocular como resultado de la absorción de la energía asociada a la radiación y su aplicación terapéutica.

Los resultados de los avances tecnológicos proporcionan una gran variedad de láseres, comenzando por los láseres de iones gaseosos, como argón y kriptón. Los numerosos estudios realizados con estos primeros prototipos, aún en uso, permitieron seleccionar parcialmente la longitud de onda más adecuada, dependiendo del objetivo clínico que se precisara (L'ESPERANCE, 1968). La absorción de energía del azul-verde emitida por el láser de argón resultaba específicamente absorbida por la hemoglobina (GEERAETS, 1962) y provocaba una coagulación intravascular, lo que constituía una estrategia muy eficaz para el tratamiento de las enfermedades

vasculares oculares (L'ESPERANCE, 1968). Este hecho desniveló el protagonismo de los láseres gaseosos hacia el de argón, aunque tanto éste como el de kriptón se mostraron eficaces en la posibilidad de crear adhesiones coriorretinianas para el tratamiento de los desprendimientos de retina (CAMPBELL, 1969). Una desventaja que mostró el láser de argón, fue su emisión en el rango azul, que es absorbida por el pigmento lúteo, por lo que fue eliminado para su aplicación en el área macular.

Posteriormente se desarrolló el láser teñido con colorantes orgánicos, con el que se podía seleccionar la longitud de onda de emisión dentro del espectro visible. Sin embargo, los resultados obtenidos resultaron discretos y no tan óptimos como se esperaba, ya que se demostró que cuando el efecto terapéutico depende fundamentalmente del daño térmico, la longitud de onda utilizada no es un factor determinante para la aplicación terapéutica, a excepción del área macular (McHUGH, 1988), donde quedó confirmado que no puede aplicarse longitudes de onda en el rango del azul.

Las grandes posibilidades terapéuticas que estos nuevos avances ofrecían a la oftalmología clínica, precisaban de un gran conocimiento experimental de los efectos histopatológicos provocados por los diferentes láseres. El objetivo fundamental de los estudios, consistía en establecer los niveles de radiación capaces de producir lesiones u otros efectos fisiológicos, el tipo de lesión originada y los márgenes de seguridad para el personal que lo utilizaba. Éstas y otras cuestiones resultaban de vital importancia para su difusión y aplicación clínica general (KOHTIAO, 1966; L'ESPERANCE, 1969a).

Por ello, los primeros estudios histopatológicos se concentraron básicamente en la descripción de la quemadura por fotocoagulación (CAMPBELL, 1969; L'ESPERANCE, 1969a; L'ESPERANCE, 1969b; POWELL, 1974; TALEFF, 1969) y los niveles de energía capaces de producir una lesión “umbral” (ROSAN, 1969; ZWENG, 1966); es decir, la energía mínima capaz de provocar una lesión visible. Posteriormente, se continuó con la determinación de los parámetros necesarios para conseguir una determinada lesión, dependientes fundamentalmente del aparato y del método utilizados.

Los avances tecnológicos continuaron y actualmente la gama de energía emitida por los láseres abarca todo el espectro visible e incluso lo sobrepasa. Así disponemos de láseres que emiten desde el ultravioleta, entre los que destaca el láser excimer, hasta la zona del infrarrojo con los láseres sólidos, como el láser de diodo de Neodimium itrio aluminio galio (Nd:YAG) o el de Galio-Aluminio-Arsénico (GaAlAs) (GÓMEZ-ULLA, 1988; L'ESPERANCE, 1989c).

Por último, hay también que destacar en el área de la investigación básica, el desarrollo de nuevas técnicas de marcaje y visualización celular, que han desembocado no sólo en el marcaje específico de las células implicadas en la lesión ocular, sino en el conocimiento de la evolución de esta lesión, buscando siempre como objetivo la recuperación fisiológica de la zona tratada y la minimización del daño provocado.

1.1.2.- EL LASER

1.1.2.1.- Principios básicos de la radiación láser.

En general, las fuentes que emiten luz son esencialmente calientes; es decir, tienen alguna fuente de energía que excita electrones. (SCHAWLOW, 1966; LIN 1993).

Los electrones atómicos, en condiciones normales, se encuentran situados alrededor del núcleo en niveles discretos de energía. El nivel de energía más bajo es el más estable, pero un electrón puede ascender a un nivel de energía más alto o excitado mediante la absorción de una determinada cantidad de energía. Así pues, los electrones pueden sufrir una excitación y por lo tanto una desexcitación, siendo el resultado de estos dos procesos la base de emisión de luz por un cuerpo. El retorno de un electrón de un nivel energético mayor a uno inferior y más estable se traduce en la liberación de un fotón, cuya energía asociada es igual a la diferencia energética entre los dos estados (BOWBYES, 1973; HAUT, 1981; PEYMAN, 1984).

Esta transferencia de un nivel de energía a otro, puede ser espontánea o estimulada. El mecanismo en el que se basa los principios del láser es la “emisión estimulada”, ya que cuantos más átomos sean estimulados simultáneamente, más intensidad poseerá la radiación emitida, lo que significa una rápida amplificación de luz. Por lo tanto, el objetivo es conseguir la máxima población de átomos en estado excitado, lo que se denomina una “inversión de población”. Esto se puede obtener por un mecanismo denominado de bombeo o “pumping”, que implica un aporte de energía (HAUT, 1981; PEYMAN, 1984; VASSILIADIS, 1989).

Por lo tanto, un emisor láser es básicamente una cámara resonante para la luz, con espejos paralelos en uno y otro extremo que continuamente están reflejando la luz producida por los átomos excitados. Si uno de estos espejos es semi-transparente y deja pasar a su través selectivamente algunas ondas, estaremos produciendo una luz láser (BOWBYES, 1973). Dependiendo de los átomos o moléculas que se estén utilizando, se conseguirán diferentes longitudes de onda.

Así pues, en un aparato láser están implicadas dos fuentes de energía de características distintas (BOWBYES, 1973):

- Por una parte, una fuente de emisión, compuesta por un material activo que posee una estructura química resonante, capaz de responder con una emisión de radiación, a una excitación provocada por otra fuente.
- Una fuente excitadora, cuya radiación estimula a la fuente de emisión.

1.1.2.2.- Características de la radiación láser

La luz emitida por un láser se caracteriza por ser monocromática, colimada, coherente, intensa y de corta duración (LIN, 1993; ZARET, 1963; ZWENG, 1964).

- *Monocromaticidad*: El objetivo óptimo es conseguir una única longitud de onda de emisión; es decir, que el intervalo de longitud de la onda emitida sea el menor posible. Una alta monocromaticidad es de gran importancia para determinar con la mayor certeza la cantidad de energía absorbida o transmitida por los tejidos biológicos y poder prever los efectos. (ALGVERE, 1990; BASS, 1977; CAMPBELL, 1963, 1966a, 1968a, 1968b, 1968c, 1969; HAUT, 1981; LEIBOWITZ, 1969; MANSON, 1972; ROSE, 1966; SOLON, 1961; VASSILIADIS, 1989; ZARET, 1963; ZWENG, 1964).
- *Colimación o poca divergencia*: La radiación láser posee un alto grado de paralelismo entre los rayos que forman el haz, (BORGES, 1987; CAMPBELL, 1968a, 1968b, 1968c; FLOCKS, 1964; LEIBOWITZ, 1969; ROSE, 1966; ZARET, 1963; ZWENG, 1964) aunque con un límite teórico, ya que toda radiación láser diverge. Cuanto menor sea la divergencia, mayor será la precisión y menor el tamaño del impacto (PEYMAN, 1984; VASSILIADIS, 1989) que se obtenga.
- *Gran coherencia*: La cámara de luz láser es resonante, es decir el fotón rebota consiguiéndose en su emisión una sincronización o coherencia (PEYMAN, 1984). Las ondas emitidas se encuentran en fase y no son divergentes (CAMPBELL, 1963; FLOCKS, 1964; LEIBOWITZ, 1969; ROSE, 1966; VASSILIADIS, 1989; ZARET, 1963).
- *Gran intensidad*: La intensidad de la radiación láser excede de la conseguida por otras fuentes en la relación densidad-potencia; es decir, en la cantidad de energía emitida por unidad de tiempo y por área de impacto (CAMPBELL 1966a, 1966b; FLOCKS, 1964; VASSILIADIS, 1989; ZARET, 1963; ZWENG, 1964).
- *Corta duración de la emisión*: Generalmente es menor de 1 mseg (CAMPBELL 1966a, 1966b, 1968a, 1968b, 1968c; LEIBOWITZ, 1969; ROSE, 1966; VASSILIADIS, 1989).

Estas características de la luz láser ofrecen la posibilidad de concentrar gran cantidad de energía lumínica en áreas de radiación extremadamente pequeñas. Si esta propiedad del láser se une a un sistema óptico eficiente, que permita enfocar y dirigir esta energía, se comprende el éxito del láser para la fotocoagulación (CAMPBELL 1963; L'ESPERANCE, 1971a, 1971b) y por tanto para el tratamiento de diversas patologías oculares.

Para utilizar el láser como fotocoagulador, hubo que estudiar en un principio, los efectos histológicos provocados por la energía absorbida por la superficie de un tejido, y así conocer sus ventajas y desventajas. Con esta intención, Flocks y col en 1964 (FLOCKS, 1964), expusieron las características ideales que debería tener un fotocoagulador láser para su uso clínico en oftalmología:

1. Niveles de energía por debajo del valor umbral que provoca una lesión.
2. Una curva de entrada-salida de energía del pulso de la radiación que permita una variación gradual dentro de un rango de éxito clínico.
3. Una energía de salida constante.
4. Una capacidad de visión al menos comparable a la de un oftalmoscopio directo.
5. Un punto de mira con un mínimo error.

6. Una buena maniobrabilidad y sencillo manejo.

Así, el láser se convirtió en el instrumento con mayores posibilidades como fotocoagulador, tanto en la industria como en la medicina. En este área, fue obviamente necesario un minucioso estudio experimental previo encaminado a conocer los efectos celulares producidos por la radiación láser sobre los diferentes tejidos biológicos, concretamente en oftalmología los tejidos oculares, antes de su aplicación clínica (SOLON, 1961; ZARET, 1961, 1963).

1.1.2.3.- Tipos de láseres

Las clasificaciones de los láseres se pueden realizar desde diferentes criterios, los más utilizados son (HAUT, 1981):

- a) Según el medio activo.
- b) Según el sistema de bombeo empleado.
- c) Según la configuración del pulso de la onda emitida.

1.1.2.3.1.- Clasificación según el medio activo

- *De naturaleza sólida:* Compuesto de una matriz dopada, es decir, que contiene impurezas de otro elemento químico que posee una disposición electrónica favorable para las transiciones (Ej. láser de rubí, láser YAG, láser de diodo de GaAlAs)
- *De naturaleza líquida:* El medio activo presenta una gran homogeneidad. En algunos casos, los oxiclóruos que se utilizan normalmente como impurezas son altamente tóxicos. (Ej. Excimer)
- *De naturaleza gaseosa:* La gran independencia de las moléculas gaseosas mejora la coherencia de la emisión y favorece la transferencia energética. (Ej. Láser de helio-neón, de argón, de kriptón, carbónico)

1.1.2.3.2.- Clasificación según los diferentes sistemas de bombeo:

El bombeo o “pumping” es el sistema por el que se consigue la “población invertida” y siempre supone un aporte externo de energía (HAUT, 1981; SCHAWLOW, 1966):

- Bombeo térmico.
- Bombeo óptico.
- Bombeo eléctrico.
- Bombeo de partículas de alta energía.
- Bombeo químico.

1.1.2.3.3.- Clasificación según la configuración del pulso

- *Láser de onda continua (CW)*: Emite un rayo continuo de radiación. Normalmente utiliza fuentes de radiación sólida o gaseosa. Generalmente, operan con bajos niveles de energía (HAUT, 1981; KOHTIAO, 1966; LIN, 1993; MANSON, 1972).
- *Láser de onda pulsante (PW)*: Libera en un corto periodo de tiempo la energía acumulada en la “inversión de población”, emitiéndose la energía en un pulso corto (del orden de los pico, fento o microsegundos). Hay varios subtipos dependiendo de la técnica empleada: “Gain-switching”, interruptor Q-electróptico o “Q-switching”, modo bloqueado o “Mode-locking”, “cavity pumping” y “pulsos repetitivos” (CAMPBELL, 1968c; CORCÓSTEGUI, 1988; KOHTIAO, 1966; LIN, 1993; MANSON, 1972; PEYMAN, 1984; ROSE, 1966; SLINEY 1992, 1993).

1.1.2.4.- El láser de diodo

1.1.2.4.1.- Introducción histórica a los láseres semiconductores sólidos

Se han requerido varias décadas para demostrar que la fotocoagulación retiniana puede resultar un método eficaz tanto para la prevención como para el tratamiento de patologías oculares tan importantes como la retinopatía diabética, degeneración macular, desprendimientos retinianos, histoplasmosis o neovascularización coroidea, (BALLES, 1990a,b; MENCHINI, 1992; SMIDDY 1992b). Sin embargo, aunque han pasado más de 50 años desde que Meyer-Schwickerath y Morón Salas realizaron las primeras fotocoagulaciones en fondo de ojo humano con luz solar, y más de 40 desde que el primer láser fue construido, todavía se está buscando la fuente de luz visible óptima para el tratamiento de las diferentes patologías oculares.

Actualmente, los láseres de gases iónicos son los más ampliamente distribuidos y utilizados, sobre todo el láser de argón que emiten en el azul-verde y verde y el de kriptón que emite en el amarillo, naranja o rojo. Sin embargo, las desventajas de su uso siguen siendo importantes: carecen de una alta eficacia en la transformación de la energía, por lo que presentan un elevado consumo, son caros, grandes y con muchos problemas en su mantenimiento. Después de un breve intento con los láseres líquidos teñidos con colorantes orgánicos y, de comprobar que no ofrecían ninguna ventaja adicional con respecto a los de gases iónicos, se comenzó a pensar en la posibilidad de los gases sólidos que emiten fundamentalmente en el rango del infrarrojo.

El láser sólido ND:YAG (Neodimium: Itrio, Aluminio, Galio) emitiendo en forma pulsante “modo Q-switch” en el infrarrojo lejano, resultó ser un instrumento eficaz para la microcirugía del segmento anterior del ojo. Sin embargo, eran las características que ofrece la luz infrarroja cercana, las que resultaban más atractivas para el tratamiento de patologías del fondo ocular. Este rango de longitud

de onda se transmite muy bien a través de los medios oculares con eficacias significativamente mayores que las obtenidas con los láseres ionizados.

En las últimas décadas, la gran presión en los campos de las comunicaciones ópticas, las nuevas técnicas de impresión óptica, video-discos, etc... y el gran progreso en la tecnología de los cristales semiconductores han permitido un fantástico desarrollo en los láseres semiconductores de diodo. Los láseres de diodo normalmente emiten en el rango del rojo lejano o el infrarrojo cercano del espectro. La última generación de estos aparatos ha logrado mejorar su eficacia más del 50% y su potencia de salida más de tres órdenes de magnitud con respecto a las más altas disponibles hace solamente unos pocos años. Por ello estos láseres son los más aconsejables para su aplicación en el campo médico, reemplazando a los láseres convencionales.

Como el tamaño de la región que emite luz en los láseres de diodo está por debajo del rango de los milímetros; se pueden desarrollar sistemas de láseres muy compactos y por tanto más manejables. Más aún, el descenso en los precios que suele seguir a una producción a gran escala de los componentes electrónicos en estado sólido, permite el abaratamiento de estos sistemas, y por tanto, es de esperar una amplia distribución como láseres médicos, especialmente en aquellos países con bajo desarrollo económico (BRANCATO, 1987a; McHUGH, 1988).

De todas las especialidades médicas, la oftalmología necesita las intensidades láseres más bajas (onda continua) para el tratamiento terapéutico y por tanto estos láseres son los ideales en esta aplicación.

1.1.2.4.2.- Características del aparato y principios básicos de su funcionamiento

Las longitudes de onda emitidas por los láseres de diodo de mayor potencia están limitadas entre los 750 y 950 nm, debido a la tecnología del cristal GaAlAs más desarrollada, aunque potencialmente pueden generar radiación en todo el espectro visible y por encima del infrarrojo hasta 30 μ m. Por otro lado, los diferentes modos de emisión que se ofrecen dentro del modo pulsado, además de la forma continua, permiten su aplicación para el tratamiento de todas las patologías oculares.

La estructura del láser de diodo representa uno de los modos más eficaces de convertir energía eléctrica en luz.

En los láseres de diodo (BALLES, 1990a; BRANCATO, 1987a) la emisión de luz coherente es producida por la recombinación estimulada por radiación de electrones libres-huecos en una unión p-n. Se sabe que un cristal semiconductor fuertemente dopado, como el GaAs, con impurezas “donantes” (átomos con un electrón valencia extra comparado con los átomos del cristal), producen una amplia densidad de electrones en una banda de conducción (C) del cristal: el cristal es entonces

llamado semiconductor tipo n. De forma similar, si las impurezas del “aceptor” son añadidas al cristal (átomos con una electrón valencia menos que los átomos del cristal) electrones desde la banda valencia (V) del cristal son capturados por los aceptores, dejando estados vacíos o “huecos” en la banda valencia (semiconductor tipo p). Los huecos se comportan como canales electricamente positivos en el cristal.

La condición para la inversión de la población y la consiguiente amplificación de luz en el cristal, requiere que todos los estados llenos de electrones en la banda C, se solapen con los estados llenos de huecos en la banda V. Para crear una estructura en la cual esta situación pueda ser completada en una unión p-n, se deben juntar un cristal tipo p y otro tipo n. Debido a la diferente concentración de los dos tipos de canales en los dos cristales, la difusión de electrones desde el material n al p ocurre, y de forma similar la difusión de huecos desde el material p al n. Este proceso vacía la zona de unión metalúrgica de cargas libres y forma una barrera potencial, que detiene cualquier tipo de corriente más allá de esta unión. La condición para la inversión de la población no está todavía conseguida ya que los electrones en la banda C excitada y los huecos de la banda V no están espacialmente superpuestos. Sin embargo, si el sistema p-n está conectado a una batería, la barrera potencial se reduce, y los niveles de población de electrones y huecos se vuelven más estrechos y superpuestos. Cuando la energía aplicada externamente se aproxima a la energía de unión, en la región de unión se encuentra una amplia población de electrones y de huecos. Los canales eléctricos (electrones y huecos) fluyen a través de la unión, y la recombinación electrón-hueco ahora es posible en una región estrecha y cercana a la unión metalúrgica.

En varios cristales semiconductores, como el GaAs, la recombinación electrón-hueco produce la emisión de un fotón. En estos cristales, la luz es entonces emitida espontáneamente en la región de unión p-n. La colección de luz puede realizarse o perpendicularmente o colinealmente con el plano de unión (superficie o borde de emisión respectivamente). Estos diodos emisores de luz (LED) están ampliamente distribuidos como lámparas de estado sólido para display, comunicación óptica, componentes optoelectrónicos, etc....

Para fabricar un láser a partir de un LED, (CLED : LED coherente) es necesaria una amplia densidad de fotones en el plano de unión y una cavidad óptica para la emisión estimulada y las oscilaciones láser. Esto se consigue con un fuerte dopage del cristal semiconductor con impurezas donantes y aceptoras para obtener grandes concentraciones de cargas libres. Por otro lado, la reducción del grosor de la capa activa se consigue con las recientes técnicas sofisticadas de crecimiento de cristales. Por último, se debe emparedar la capa activa entre las capas con diferente composición atómica para así obtener una brusca variación de las características eléctricas y ópticas de la capa activa. Se han conseguido grosores de 30 nm con un alto confinamiento de recombinación electrón-hueco.

La cavidad resonante normalmente consiste en dos laterales opuestos perpendiculares al plano ópticamente pulido de unión del diodo y deseablemente recubierto por capas dieléctricas reflectantes. La emisión en onda continua o pulsada se puede obtener eligiendo la estructura propia del diodo.

La dimensión longitudinal del diodo normalmente es de 0.5 mm; así pues, la estructura total del diodo, tiene un tamaño por debajo del mm. Por ello, se pueden obtener fuentes láser de alta potencia extremadamente compactas.

La longitud de onda del láser de diodo depende principalmente del material de la banda de unión en el cual los electrones y los huecos se recombinan. Los láseres semiconductores cubren un rango espectral, que se extiende desde la mitad del visible, hasta la mitad del infrarrojo. El material del láser de diodo más estudiado es el GaAs y posteriormente el GaAlAs cuyas longitudes de onda cubren el intervalo del rojo lejano al infrarrojo cercano (750-950 nm)

1.1.3.- FENÓMENOS FÍSICOS PRODUCIDOS POR LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA SOBRE LOS MEDIOS OCULARES

La luz o el rayo láser son ondas electromagnéticas que cuando inciden o alcanzan una superficie o un medio, pueden verse sometidas a diversos fenómenos dependiendo de las propias características de la onda incidente y del medio alcanzado. La onda puede ser absorbida, reflejada y transmitida en diferentes porcentajes (LIN, 1993).

Cuando un rayo de luz incide sobre la pupila, debido a las diferencias de los índices de refracción entre el aire y el tejido corneal, un porcentaje de esa cantidad de luz penetra en la cavidad ocular. De igual forma, la luz que sale de la córnea debe igualmente atravesar el humor acuoso, el cristalino y el humor vítreo hasta alcanzar la superficie retiniana (BOETTNER, 1962; KIDWELL, 1976; L'ESPERANCE, 1989b; McDONALD, 1957; MORÓN-SALAS, 1950; SOLON, 1961) Dependiendo de los índices de transmisión o absorción de la longitud de onda que atraviesa estos medios, la cantidad de luz, y por tanto de energía que alcance finalmente el tejido diana, es decir el fondo ocular retiniano, puede variar considerablemente..

Por tanto, la transmisión y absorción de energía de cada uno de estos medios al paso de la luz, son magnitudes inversas pero de gran importancia, ya que determinan el tipo y la intensidad del efecto que se originará en la estructura tisular (Ley de Drapers), así como los posibles mecanismos fisiológicos implicados (McDONALD, 1957).

1.1.3.1.- Estudios de transmisión de los medios oculares transparentes

Aschkinass en 1895 fue pionero en presentar los trabajos que determinaron los valores de absorción del agua para ondas con longitudes en el extremo rojo e infrarrojo del espectro, así como la absorción en la córnea, humor acuoso, humor vítreo y cristalino (LUDVIGHT, 1938; WIESINGER, 1956).

La revisión de estos trabajos llevada a cabo por Luckiesh en 1928, le permitió determinar que la absorción de luz visible a su paso por el medio ocular es equivalente a la obtenida en una capa de

agua de 2,28 cm, de profundidad (LUDVIGHT, 1938). Estos resultados fueron posteriormente confirmados por Duke-Elder, quien estableció el valor de la absorción en el espectro visible a su paso por el medio ocular en 8%, mientras que la transmisión es inferior al 70% (WEALE, 1962).

Por otro lado, según Ludvigh y McCarthy en 1938, no existen grandes diferencias de los valores de absorción en función de la longitud de onda incidente (LUDVIGHT, 1938).

Wiesinger y col en 1956 (WIESINGER, 1956) estudiaron la transmisión a través del medio ocular del conejo en diferentes rangos de longitudes de onda, obteniendo valores similares a los obtenidos en medios acuosos o soluciones salinas. Estos estudios se completaron cuando Geeraets y col. (GEERAETS, 1960) concluyeron que la absorción de los medios oculares de conejos y humanos eran muy similares.

Los trabajos de Solon y Rose (ROSE, 1966; SOLON, 1961) aportaron un nuevo concepto: los porcentajes de transmisión a través de los medios oculares son mayores cuanto más larga es la longitud de la onda incidente.

Boettner y Wolter (BOETTNER, 1962; WIESINGER, 1956) explicaron los valores dispares obtenidos por distintos autores en estudios similares atribuyéndolos a las diferencias de edad de los individuos de donde procedían los ojos, y resaltaron la importancia del tiempo transcurrido hasta la enucleación, la precisión de la instrumentación para las mediciones y otros factores.

Geeraets y col. (GEERAETS, 1962, 1966) determinaron que la absorción del medio ocular humano para longitudes de onda en el rango de 350 a 1500 nm es de un 45%. Este valor es similar en las diferentes razas humanas al tratarse de medios transparentes, al igual que en diferentes especies animales como conejos, monos y humanos.

En 1976, Kidwell y col. (KIDWELL, 1976) definieron el término "*Transmitancia del Medio Ocular*" (TOM) como la fracción de la potencia radiante incidente sobre la córnea que es capaz de alcanzar la retina. Utilizando un láser de argón con emisiones de onda entre 480 y 514,5 nm en conejos pigmentados, determinaron el coeficiente de transmisión en córnea como 0,85, valor muy similar al 0,89 obtenido por el equipo de Geeraets en el mismo animal una década antes. Al comparar los valores "in vitro" con los obtenidos "in vivo" confirmaron las opiniones de Boettner (BOETTNER, 1962) en cuanto a la gran importancia de determinados factores como por ejemplo, el tiempo transcurrido hasta la enucleación.

Un estudio publicado por Algvere en 1993 (ALGVERE 1993) mostró que la transmitancia en el ojo del conejo "in vivo" es muy alta, superior al 90% en el intervalo entre 525 y 860nm, con un pico del 96% a 700nm. En el espectro del infrarrojo, la transmitancia es muy cercana al 90% hasta los 900nm, pero disminuye para longitudes de onda más largas, coincidiendo con la absorción del agua pura. Estos resultados son superiores a los señalados previamente por el resto de autores, debido

posiblemente al hecho de que este experimento fue realizado en animales vivos y no en cadáveres o en ojos enucleados.

Todos estos trabajos determinaron una serie de curvas de transmisión similares a las del agua y que están en función de la longitud de onda utilizada. Estas curvas sirven para prever la cantidad aproximada de radiación que llega al polo posterior ocular donde se encuentran las superficies pigmentadas con melanina, hemoglobina y xantofila. La presencia de estos pigmentos en las células del EPR y melanocitos coroideos, los vasos sanguíneos y la mácula respectivamente, son responsables del fenómeno de absorción de energía que ocurre en estas estructuras y que es el origen de la lesión principal o primaria de la radiación o fotocoagulación (MARSHALL, 1981; l'ESPERANCE 1989b). Coscas (1983) advirtió que, a medida que aumenta la longitud de onda, aumenta la transmisión en los medios opacificados o con hemorragias, resaltando las propiedades del rango rojo e infrarrojo para estos casos.

1.1.3.2.- Estudios de absorción en los sistemas pigmentados.

Aunque son varios los pigmentos o cromóforos presentes en el ojo, sólo algunos de ellos resultan importantes para los procesos de fotocoagulación: la melanina del EPR y coroides, los pigmentos sanguíneos y la xantofila de la mácula.

1.1.3.2.1.- La melanina en las células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) y los melanocitos coroideos.

Los estudios reseñados anteriormente realizados por el equipo de Geeraets y col. en 1960 (GEERAETS, 1960) ofrecieron una explicación a las diferencias de los valores de absorción obtenidos por varios autores, atribuibles al proceso de enucleación. Efectivamente, la ausencia de sangre o esclera (producida por la enucleación y manejo del material) sería la responsable de estas variaciones. Así, la presencia o no de pigmentos puede variar la absorción y transmisión de una estructura; razonamiento igualmente válido para explicar las diferencias de los valores obtenidos en conejos pigmentados y albinos, discrepancias señaladas anteriormente por Morón-Salas en 1950 (MORÓN-SALAS, 1950). La conclusión pues de estos trabajos fue que los valores de absorción del medio ocular y el fondo de ojo del conejo pigmentado son muy parecidos a los del ojo humano (sobre todo entre 400 y 1000 nm), por lo que este animal resulta idóneo para estudios experimentales en este campo. Por otra parte, la absorción de la energía del fondo ocular está directamente relacionada con el grado de pigmentación de las estructuras retinianas y coroideas.

Estos trabajos fueron ampliados por el mismo equipo de Geeraets y col. (GEERAETS, 1962, 1966) con el estudio de la absorción en las células del EPR y coroides del ojo humano, contrastando las distribuciones de los pigmentos en diferentes razas humanas. Así, los individuos de raza negra, más pigmentados, presentan mayores valores de absorción en el EPR que los individuos de raza

blanca. Por último, concluyeron que la absorción de la energía radiante en el EPR humano es el factor determinante para provocar una quemadura leve o “quemadura umbral”. Este hecho es debido a la mayor concentración de pigmento en estas células epiteliales en comparación con las coroideas.

Los estudios de Gabel en 1977 y Marshall en 1981 (MARSHALL, 1981) muestran que en la zona del EPR se produce una mayor absorción de las ondas con longitudes en el azul-verde que en el rojo. Es decir, hay una absorción diferencial de energía por parte de la melanina. La absorción disminuye a medida que aumenta la longitud de onda, lo que explica que se necesiten mayores potencias para provocar lesiones similares con longitudes de onda menores (McHUGH, 1988). Concretamente, para Marshall, el EPR actúa como un filtro que atenúa las radiaciones visibles que alcanzan la coroidea. Así, cuando una radiación en el espectro visible alcanza la retina, el 40% de su energía asociada es absorbida por las células del EPR y el 55% restante por los melanocitos coroides. Ciertamente, en términos absolutos, es mayor la cantidad de energía absorbida en la coroidea con respecto a la retina, sin embargo el autor destaca que la melanina situada en la zona apical de las células del EPR se encuentra concentrada en una zona de 4 micras de espesor. Por ello, la energía absorbida por unidad de superficie es mayor en esta zona que en el resto del área coroidal. Esta energía se transforma posteriormente en calor, provocando un aumento de la temperatura local (MARSHALL, 1981; McHUGH, 1988)

En este sentido, Mainster (MAINSTER, 1986, 1989) estudió la conversión de la energía luminosa en calor, intentando determinar las longitudes de onda óptimas para provocar una fotocoagulación macular. Con su estudio concluyó, que la melanina es el pigmento ocular con mayores valores de absorción de energía y además se mantienen casi constantes en todo el espectro visible, por lo que no es un factor excluyente o determinante para la fotocoagulación macular. Por otra parte, el hecho de que la absorción es inversamente proporcional a la longitud de onda empleada, explicaría la mayor profundidad de las quemaduras a medida que se aumenta la longitud de onda.

1.1.3.4.2.- La hemoglobina sanguínea en los vasos retinianos y coroides.

En relación con este pigmento sanguíneo, Geeraets (GEERAETS, 1962) comparó en conejos pigmentados, la absorción obtenida en los vasos coroides llenos de sangre o perfundidos con suero salino. Estableció en 10% la absorción por estos pigmentos sanguíneos de la luz incidente sobre la córnea y que la absorción de la hemoglobina era mayor para longitudes de onda entre 500 y 600 nm. Estudios “in vitro” de L’Esperance obtuvieron resultados similares (L’ESPERANCE, 1966).

Wood (WOOD, 1969) en 1969 señaló y Mainster (MAINSTER, 1986) en 1986 confirmó las diferencias de absorción entre la oxihemoglobina y la hemoglobina reducida.

Distintos autores presentaron los resultados de la absorción de la hemoglobina en el espectro visible apareciendo valores elevados en los rangos del azul, verde y amarillo, disminuyendo progresivamente en el rojo (FOLCK, 1985; GEERAETS, 1962; L'ESPERANCE, 1968, 1989b; WOOD, 1969). Esta disminución de la absorción en el rojo es mayor para la hemoglobina oxidada que para la hemoglobina reducida. En opinión de Mainster (MAINSTER, 1986), este hecho explica que se observen más prominentes las venas respecto a las arterias cuando son observadas por un oftalmoscopio.

1.1.3.4.3.- La xantofila en el área macular

La mácula es el área de la retina, donde entre otras características anatómicas e histológicas, presenta la mayor sensibilidad para la visión, siendo el pigmento macular la xantofila.

Algunos estudios se dedicaron a la determinación de los valores de radiación umbral o mínimos de seguridad, cuya primera observación fueron las diferencias existentes entre la mácula y el resto de la retina, resultando la primera mucho más sensible y vulnerable. Campbell y col (CAMPBELL, 1966a, 1966b) y Lappin (LAPPIN, 1970), mostraron que la mácula resultaba dañada con valores de energía significativamente inferiores a los necesarios para el resto de la retina (BLAIR, 1972; LEIBOWITZ, 1969; TSO, 1977).

Una de las explicaciones para este hecho, según Friedman y Kuwabara en 1968 (FRIEDMAN, 1968), es la mayor concentración de melanina en las células del EPR del área foveolar humana, provocando por tanto una mayor absorción de energía en esta zona macular. Por otra parte, Lappin y Cogan (1970) (LAPPIN, 1970) sugirieron que otro factor podría ser el menor espesor retiniano de esta zona que reduce la atenuación del rayo incidente. Otros autores (BÜLOW, 1978; MARSHALL, 1975; TSO, 1973) resaltaron una mayor susceptibilidad a la radiación por parte de los conos (únicas células fotorreceptoras que se concentran en el área macular) en comparación con los bastones (células fotorreceptoras propias del resto de la retina, fuera de la mácula).

Los autores que se dedicaron al estudio de la absorción de la xantofila mostraban una curva bicuspidada en 460 y 490 nm y situaron el pigmento amarillo en las capas plexiforme interna y externa de la retina macular, destacando la elevada absorción de longitudes de onda en el rango azul, disminuyendo en el verde y siendo mínimas en el amarillo y rojo (L'ESPERANCE, 1989b; MAINSTER, 1983; MARSHALL, 1975).

1.1.4.- EFECTOS DE LA RADIACIÓN SOBRE LOS TEJIDOS OCULARES

El conocimiento de los mecanismos implicados en la acción que ejerce una radiación cuando alcanza la materia viva es de una importancia crucial, cuando se pretende una aplicación clínica de un aparato, fenómeno o tecnología. En este caso, el abordaje de este conocimiento lo enfocamos

desde dos grandes bloques de estudio. Por una parte, el conocimiento exhaustivo de los factores implicados en la determinación de una lesión, y por otro, en el estudio de estas lesiones; es decir los efectos directos e indirectos que una radiación puede provocar cuando alcanza un tejido biológico. El objetivo final es conocer cómo y por qué se crea un determinado tipo de lesión, y así poder escoger los parámetros exactos y diseñar procedimientos para su aplicación clínica en cada caso.

1.1.4.1.- Factores que determinan una lesión por radiación láser.

1.1.4.1.1.- La longitud de la onda emisora.

Los láseres pueden ser monocromáticos, es decir emitir una única longitud de onda (ej. el láser de rubí) y policromáticos, donde se puede elegir la onda de emisión entre un rango (ej. el láser teñido con colorantes orgánicos). (BASS, 1977; KATOH, 1988; L'ESPERANCE, 1985, 1989b; SMIDDY, 1988).

Conociendo la longitud de onda, conocemos la energía asociada, y podemos por tanto predecir aproximadamente tanto la cantidad de energía absorbida en los medios oculares antes de que se alcance el tejido diana, así como el porcentaje que será absorbido por éste (CORCÓSTEGUI, 1988; COSCAS, 1983; HAUT, 1981; MARSHALL, 1975; VAN DER ZYPEN, 1986). La energía asociada a una onda electromagnética viene definida por la fórmula:

$$E = h \cdot \gamma$$

Siendo h la constante de Planck y γ la frecuencia que posee la onda electromagnética.

Como la frecuencia es la inversa de la longitud de onda ($\gamma = 1/\lambda$) la energía podría determinarse como:

$$E = h/\lambda$$

Los láseres emiten longitudes de onda desde los 300 nm en el rango del ultravioleta hasta los $337 \cdot 10^3$ nm en el infrarrojo lejano. Según la fórmula, es fácil deducir que cuánto mayor sea la longitud de onda menor es la cantidad de energía asociada y viceversa.

1.1.4.1.2.- La potencia

Se entiende como potencia de salida, la cantidad de energía emitida por unidad de tiempo. Los láseres emiten en un amplio rango de potencias, desde algunos μW hasta varios miles de W.

$$1 \text{ watio} = 1 \text{ Julio}/1\text{segundo}$$

Fundamentalmente, la potencia depende de la naturaleza del medio activo, pero también del modo de funcionamiento (SCHALOW, 1966).

1.1.4.1.3.- Duración de la emisión

Por lo anteriormente expuesto, se deduce que el tiempo también es otro factor muy importante. Anteriormente, se describieron los modos de emisión de la radiación láser, que podía ser en forma continua o pulsante. Los láseres que emiten energía de forma continua son los más utilizados y normalmente el investigador decide la duración de la emisión, generalmente no supera el segundo y suele ser entre 200 mseg hasta 500 msg. El tiempo durante el cual el tejido está sometido a la radiación, está directamente relacionado con el efecto principal y la intensidad del mismo (KUWABARA, 1968, 1970; VAN DER ZYPEN 1986). Así para tiempos de exposición largos, fundamentalmente ocurre una elevación de la temperatura predominando un efecto térmico, mientras que para tiempos cortos, los efectos provocados son de tipo electromecánico (HAUT, 1981).

Los láseres “pulsantes”, producen unas emisiones muy cortas, normalmente asociadas a potencias muy altas; por ello, su uso clínico es restringido. Debido al riesgo de accidentes, sus efectos fueron ampliamente estudiados para conocer los límites de seguridad y normas de empleo (HAUT, 1981; LEIBOWITZ, 1969; MANSON, 1972; PEYMAN, 1984; ROSE, 1966; SETOGAWA, 1973). El riesgo de hemorragia, complicación clínica a evitar, aumenta con la disminución de la duración del pulso y está relacionada con la velocidad a la que los fluidos del tejido son convertidos en gas. Cuanto más rápidamente los tejidos adquieran la energía térmica, más rápidas serán las transiciones de fase y los cambios volumétricos. En la retina externa (McHUGH, 1988), si los episodios térmicos son suficientemente rápidos, entonces los cambios volumétricos asociados pueden resultar en un desplazamiento físico masivo del tejido con rupturas de estructuras como la membrana de Bruch o la coriocapilar (CC).

Una posibilidad dentro de los láseres pulsantes, consiste en la ampliación del tiempo de emisión de los pulsos, lo que permite trabajar a potencias menores consiguiendo efectos semejantes a los conseguidos con mayores potencias y tiempos más cortos. Este sistema de pulsos repetitivos de baja potencia podría evitar el riesgo de hemorragia y permitiría seleccionar una longitud de onda que optimice la fotocoagulación (CORCÓSTEGUI, 1988; GEERAETS, 1966; SLINEY, 1992; TRIVIÑO 1997a).

1.1.4.1.4.- Tamaño y forma de la imagen

Como se ha referido anteriormente, el alto grado de coherencia, colimación y cromaticidad de la radiación láser, implica la posibilidad de obtener altas densidades de energía, es decir gran

cantidad de energía por unidad de superficie. Las unidades que se utilizan son W/cm^2 para el modo continuo o J/cm^2 para el modo de emisión pulsante (HAUT, 1981; SOLON, 1961).

Aunque la colimación hace referencia al alto grado de paralelismo de los rayos que forman el haz luminoso, siempre existe un grado de divergencia, que se añade al creado por los sistemas ópticos que se utilizan para el manejo del aparato, además del provocado por las opacidades de los medios oculares. Por tanto, la imagen que se forma sobre la retina como tejido diana varía tanto en su forma como en su tamaño. En este sentido, si el haz no es totalmente perpendicular a la superficie irradiada o ésta no es totalmente plana, también la forma teóricamente esférica de la imagen variará (HAUT, 1981; LEIBOWITZ, 1969; PEYMAN, 1980; POMERANTZEFF, 1975) hacia formas más elípticas.

Por otra parte, la dimensión y la forma de la superficie irradiada determinan el reparto de la energía y la temperatura, así como el tipo de efecto y la intensidad de la lesión. Por ello, es más correcto hablar de densidad de potencia, que de potencia únicamente; ya que en el término densidad de potencia se encuentran incluidos los términos potencia, tiempo de exposición, tamaño y forma de la imagen (HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; MAINSTER, 1983; POMERANTZEFF, 1975; SOLON, 1961).

Por último, es necesario recordar la importancia de la naturaleza del tejido irradiado, su composición molecular o su estructura. Estas características determinan la absorción de la energía y por tanto influirán en gran medida en el tipo de efecto que se puede provocar (COSCAS, 1983; FLOCKS, 1964; HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; MAINSTER, 1983; MARSHALL, 1975).

1.1.4.2.- Tipos de efectos tisulares

Cuando una radiación electromagnética emitida por un rayo láser alcanza un tejido biológico provoca una lesión que es determinada por distintos tipos de efectos (SLINEY, 1988; BALLE, 1990a):

1.1.4.2.1.- Efecto térmico

Está relacionado con la absorción por el medio biológico de energías asociadas a longitudes de onda situadas en el rango visible e infrarrojo; es decir, depende de la longitud de onda emitida y de la estructura química o histológica del tejido diana donde se va a efectuar la absorción y por tanto la conversión de la energía asociada a la onda en calor (HAUT, 1981; LIN, 1993; MAINSTER, 1986, 1989; PEYMAN, 1984).

Algunos investigadores (FRIEDMAN, 1968; NOELL, 1966) encontraron evidencias que relacionaban la temperatura corporal del animal expuesto a una radiación con la susceptibilidad del

EPR a la radiación láser, resaltando la relación del efecto observado en la superficie retiniana con el calor.

El proceso se basa en la transferencia de energía desde los fotones de la radiación láser a las moléculas del tejido irradiado. Esta energía se transforma en energía calorífica, provocando un aumento de la temperatura, razón última de la lesión que se provoca (BÜLOW, 1978; HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; LIN, 1993; MAINSTER, 1983, 1986, 1989; MARSHALL, 1975, 1981; MORÓN-SALAS, 1950; NOYORI, 1963; POWELL, 1971; TSO, 1973). Así, hay una relación proporcional, de forma que cuanto mayor sea la cantidad total de energía que alcance una superficie, mayor será la elevación térmica (BERGQUIST, 1965; CAMPBELL, 1968a; GEERAETS, 1962). Como se ha comentado anteriormente, en este campo es más correcto referirse a la densidad de potencia donde se encuentran incluidos la potencia, el tiempo de exposición y el área irradiada (CAMPBELL, 1968a; HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; PEYMAN, 1980; ROSE, 1966; ZWENG, 1966).

Cuando la temperatura supera los 55° C, o también se asume que cuando la temperatura es 10-20°C por encima de la temperatura ambiente, se produce la desnaturalización proteica, (ANSELL, 1976; HAM, 1980; PATZ, 1972; PEYMAN, 1983,1984; ROSE, 1966; TSO, 1983) es decir su “fotocoagulación”, provocando una “mancha” en la superficie retiniana del fondo ocular, fácilmente visible (BOWBYES, 1973; CAMPBELL, 1966a, 1966b, MAINSTER, 1986, 1989). La percepción de esta *mancha* se utilizó como criterio para determinar el valor umbral de lesión, es decir el mínimo valor capaz de provocar una “mancha” o lesión (CAMPBELL, 1968b; FLOCKS, 1964; FRIEDMAN, 1968; GEERAETS, 1966; HAM, 1970; HAUT, 1981; KOHTIAO, 1966; LAPPIN, 1970; LEIBOWITZ, 1969; L'ESPERANCE, 1969a; POWELL, 1974; ROSAN, 1969; TALEFF, 1969).

El calor se transmite en función del tamaño del impacto y del tiempo de exposición (HAM, 1980; L'ESPERANCE, 1965; MAINSTER, 1986; MARSHALL, 1975; PEYMAN, 1984; ROSAN, 1969). Es decir, la elevación de la temperatura no sólo afecta a la zona directamente irradiada, sino que por fenómenos de conducción, el calor se transmite a las zonas periféricas del impacto (BORGES, 1987; KATOH, 1988; L'ESPERANCE, 1965, 1966, 1968; MAINSTER, 1989; TSO, 1973, 1977; VOGEL, 1992; WALLOW, 1977). Si la superficie irradiada presenta una estructura y composición homogénea, se puede prever el efecto de la conducción y conocer el alcance aproximado de la lesión térmica. Sin embargo, los tejidos biológicos presentan una gran heterogeneidad, por lo que, por un lado es muy importante establecer detalladamente y para cada caso los parámetros que determinan el efecto térmico y, por otra parte, estudiar los efectos secundarios que aparecen en el tejido biológico y que no son detectados en otros materiales y que pueden, por tanto, resultar imprevisibles.

Además del mecanismo de conducción del calor a zonas no directamente irradiadas, el fenómeno de convección de calor por el flujo sanguíneo puede provocar una disminución de la temperatura local (HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1966).

La disipación del calor por estos mecanismos mencionados (conducción y convección), ocurre con exposiciones prolongadas, es decir pulsos largos; mientras que resulta inapreciable para pulsos cortos (HAUT, 1981; PEYMAN, 1984; ROSE, 1966), de hecho se habla de varios modelos de efectos provocados por la disipación del calor en la retina. En todos los modelos se asume que el principal sitio de absorción de energía es la melanina del EPR y los melanocitos coroideos. La magnitud de la temperatura alcanzada y el tiempo que se requiere para bajarla hasta el equilibrio, depende del tamaño del impacto y del tiempo de exposición. Para exposiciones cortas, menores de 1ms la contribución de la coroides al incremento de la temperatura es mínimo, y el flujo de calor suele discurrir hacia la retina neural, correspondiendo con una lesión en forma de disco fino, que implica casi únicamente la porción apical del EPR donde se localizan los melanosomas. Para exposiciones con duraciones más largas, se debe tener en cuenta el flujo de calor desde la coroides. El modelo de lesión, es entonces un cilindro donde la disipación de calor de forma radial es considerable (HAM 1980).

Por lo tanto, el calentamiento de una superficie biológica provoca una serie de efectos entre los que señalamos:

- Desnaturalización proteica y de ácidos nucleicos, modificando estructuras y alterando o inactivando determinadas funciones (AMY, 1965; GEERAETS, 1960, 1966; HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; MAINSTER, 1983, 1986, 1989; PEYMAN, 1984; POWELL, 1971; ROSE, 1966; TSO, 1983) llegando incluso a producir la muerte celular (SMIDDY, 1986; VAN DER ZYPEN, 1986, 1990).
- Por conducción, afectación de tejidos transparentes no directamente irradiados (MAINSTER, 1983, 1986; ROSE, 1966).
- Evaporación de líquidos provocando la destrucción de los tejidos. El vapor de agua y los gases formados cuando se liberan, desencadenan un efecto mecánico, asociado al térmico (efecto termomecánico), visible porque aparecen agujeros y hemorragias (BORWEIN, 1977; BOWBYES, 1973; CAMPBELL, 1968a, 1968b, 1968c, 1969; FLECK, 1991; FLOCKS, 1964; GEERAETS, 1966; HAUT, 1981; LIN, 1993; MAINSTER, 1983, 1986, 1989; MARSHALL, 1975; McHUGH, 1988; NOYORI, 1964; PATZ, 1972; PEYMAN, 1974a, 1974b, 1984; ROSE, 1966; SLINEY, 1988, 1992; WALOW, 1977; ZWENG, 1964). Este efecto suele ocurrir con intensidades altas y tiempos de exposición muy cortos.
- Efectos indirectos y la mayoría aún desconocidos, como destrucción de uniones celulares en el EPR (BORWEIN, 1977; BÜLOW, 1978; CLOVER, 1988; McNAUGHT, 1977; PEYMAN, 1972, 1983, 1984; TSO, 1983).

Durante muchos años, se realizaron estudios con diferentes láseres que emitían a diferentes longitudes de onda con el objetivo de elegir la óptima. Debido a la versatilidad del láser teñido con colorantes orgánicos, se pensó que este aparato era el ideal para cualquier patología. Este láser permitía seleccionar la longitud de onda de emisión dentro del espectro visible y así usar

selectivamente cada longitud de onda en función del tejido diana que se quisiera tratar. Sin embargo, en opinión de algunos autores (ANDRÉS, 1993; McHUGH 1988; SLINEY, 1993) cuando un efecto terapéutico es dependiente de un mecanismo de daño térmico, como es el resultado de la absorción y degradación de energía en los sistemas pigmentados de la retina externa y de la coroides; entonces la elección de longitud de onda no es significativamente importante; siempre fuera del área macular (se absorbe radiación entre 300-500 nm). Si la energía ha sido depositada durante el tiempo suficiente en cualquier sistema absorbente como para elevar la temperatura y producir desnaturalización proteica y fotocoagulación, entonces esta elevación de la temperatura será conducida hasta distancias lo suficientemente amplias como para atravesar elementos de los otros sistemas absorbentes y por tanto se habrá perdido cualquier tipo de especificidad. En la tesina previa a esta tesis (ANDRÉS, 1993), que se realizó con el láser teñido con colorantes orgánicos, se confirma que para longitudes de onda más largas, la fotocoagulación alcanza mayor profundidad en la coroides y añade como novedad las importantes hemorragias, lesiones retinianas y coroides, mucho más intensas de las esperadas en relación con los pigmentos oculares, que se observaron con la longitud de onda en el rango del naranja (595 nm). La intensidad de las lesiones, no podía explicarse únicamente por la absorción de la energía asociada a la onda por parte de la melanina, sino que se discute la posibilidad de la presencia de un cromóforo específico que absorba la energía en esa longitud de onda, como ha sido también discutido en otros estudios (SLINEY, 1988).

1.1.4.2.2.- Efecto fotoquímico

Desencadena una alteración química del tejido produciendo dimerización, isomerización, sustitución, oxidación y reducción de las moléculas (LIN, 1993; MAINSTER, 1989; PEYMAN, 1984; SOKOLOVSKY, 1990).

Este efecto aparece fundamentalmente con λ cortas, que en el rango del ultra-violeta (SLINEY, 1988, 1992) llevan asociadas grandes cantidades de energía. Ocurren sobre todo en la córnea, ya que el tejido corneal es opaco a las λ menores de 380 nm. Sin embargo, en la retina, este tipo de efecto puede provocar lesiones irreversibles, por ello, en el tejido retiniano se suelen utilizar longitudes de onda mayores, potencias muy débiles y tiempos de exposición más largos (HAUT, 1981).

1.1.4.2.3.- Efecto eléctrico

El paso de una radiación por un medio, perturba la configuración electrónica de los átomos de la materia irradiada, pudiéndose modificar sus características estructurales y sus funciones (HAUT, 1981; LIN, 1993; MAINSTER, 1983, 1989).

1.1.4.2.4.- Efecto mecánico

El efecto Brillouin son las vibraciones del medio originadas por el retorno al nivel fundamental de los átomos excitados previamente por una irradiación (HAUT, 1981; MAINSTER, 1983). Esto puede originar efectos destructivos en diversos medios y en estructuras tisulares (HAUT, 1981) y celulares (AMY, 1965), lo que se conoce como efecto mecánico. La intensidad de las lesiones es similar a la producida de forma mecánica (efecto termomecánico) asociada a la elevación de la temperatura y señalada anteriormente.

Algunos autores, consideran un efecto electromecánico, que produce una rotura óptica, normalmente asociado al uso de láseres pulsados (picos de muy corta duración con grandes cantidades de energía). El medio irradiado se ioniza formando un "plasma" que al expandirse forma una onda de choque acústica, que provoca la rotura del tejido (LIN, 1993; MAINSTER, 1983, 1986, 1989; PEYMAN, 1984; SLINEY, 1988, 1992).

1.1.5.- HISTOPATOLOGIA DE LAS LESIONES OCULARES PRODUCIDAS POR RADIACIONES EMITIDAS POR EL LÁSER DE DIODO

1.1.5.1.- Características de la radiación emitida por el láser de diodo

Los láseres de diodo de los que se obtienen mayores potencias, son los que tienen como material semiconductor el GaAlAs (Galio Aluminio Arsénico). Las longitudes de onda se encuentran en el rango de 750 a 950 nm para este material (BRANCATO, 1987a, 1988).

Como indican algunos estudios, en la región del infrarrojo cercano del espectro, entre 800 y 900 nm, los valores de transmisión ocular son máximos (BOETTNER, 1962; GEERAETS, 1968; MCHUGH, 1995), ya que existe una pobre absorción por el agua, medios oculares y tejidos no pigmentados. Aunque es cierto que el fenómeno de reflexión que ocurre en la retina humana es mayor cuanto mayor es la longitud de onda utilizada, la reflexión total es tan baja que puede ser ignorada (MCHUGH, 1988).

Por otra parte, cuando aumenta la longitud de onda disminuye la cantidad de energía asociada, ello explica que hagan falta significativamente mayores cantidades de energía con el láser de diodo para conseguir lesiones similares a las obtenidas con el láser de argón, según las observaciones de algunos autores tanto en modelos experimentales como ensayos clínicos (BALLES, 1990a,b; BENNER, 1992).

Sin embargo, este rango de longitudes de onda infrarrojas presenta unos valores de absorción por la melanina y la oxihemoglobina menores que para los láseres de gases iónicos que emiten en longitudes de onda menores; como el azul, verde, amarillo e incluso rojo, lo que teóricamente contribuye para alcanzar una mayor profundidad de la lesión en la coroides, ya que se disminuye la

absorción en el EPR y por tanto, mayor cantidad de energía alcanza la coroides, donde al ser pobremente absorbida por los pigmentos sanguíneos, alcanza mayor profundidad (BALLES, 1990a,b; JOHNSON, 1995; VOGEL, 1992; WALLOW 1991). Estas características han sido utilizadas para aumentar la absorción vascular de la sangre con una inyección intravenosa de colorantes sanguíneos. La aplicación más utilizada es la indocianina verde, colorante con un pico de absorción que coincide con la longitud de onda de 800 nm emitida por el láser de diodo (BALLES, 1990a,b). Esta técnica está resultando especialmente útil para la fototerapia de las patologías maculares, ya que la longitud de onda de emisión está fuera del espectro de absorción de la xantofila.

Por todo ello, el láser de diodo GaAlAs parece ser el más útil para las fotocoagulaciones coriorretinales usando irradiación transpupilar tanto con oftalmoscopio indirecto como acoplado a una lámpara de hendidura (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; McHUGH, 1995; MENCHINI, 1992; SMIDDY, 1992b) y/o con irradiación transescleral (SMIDDY, 1992a, 1992b) de contacto con fibra óptica e incluso con la endofotocoagulación (DUKER, 1989; PULIAFITO, 1987; SATO, 1992; SMIDDY 1992a).

Para lograr estas aplicaciones terapéuticas, previamente se han tenido que realizar numerosos estudios experimentales en diferentes modelos animales y estudios clínicos en humanos.

1.1.5.2.- Estudios oculares histopatológicos de las lesiones producidas por la fotocoagulación con el láser de diodo

1.1.5.2.1.- El conejo como animal de experimentación

La mayoría de los estudios experimentales en conejos (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988, 1989; DUKER, 1989; LANZETTA, 2006; McHUGH, 1988, 1990, 1995; MENCHINI, 1992; PULIAFITO, 1987; SATO, 1992; TRIVIÑO, 1995b, 1997a) coincidieron en localizar el daño retiniano producido por el láser de diodo fundamentalmente en la retina más externa, con características similares a los obtenidos con los láseres gaseosos, como el kriptón que emite en el rojo, resaltando la capacidad de adhesión coriorretiniana que se obtenía. Según estos trabajos, las células que resultaban más alteradas eran los fotorreceptores y las células del EPR, por ello el daño retiniano se localizaba con una extensión máxima hasta la CNI, aunque algunos autores señalaban ligeras alteraciones en la retina interna (BRANCATO, 1989; LANZETTA, 2006; SMIDDY, 1992a; TRIVIÑO, 1995b, 1997a), o en esclera (BENNER, 1992) atribuibles a las diferencias en los parámetros y metodología utilizados en cada caso. Los estudios también coincidían en resaltar obliteraciones así como desórdenes pigmentarios en la coroides, con una profundidad variable dependiendo de la intensidad utilizada.

En general, los autores coinciden en que las lesiones observadas se basan en el efecto térmico, provocado por la absorción de energía, fundamentalmente en el EPR, donde se origina el efecto fotocoagulativo y que se desplaza desde el EPR hasta la coroides (McHUGH, 1995; VAN DER

ZYPEN, 1986). Algunos autores también señalan, que el desplazamiento de fluido desde esta zona de absorción hacia la retina interna es el responsable de las alteraciones observadas a este nivel (McHUGH, 1988; LANZETTA, 2006; TRIVIÑO 1995b, 1997a).

El equipo de Brancato y col. publicaron varios trabajos experimentales con distintos tipos de láser de diodo y con diferentes aplicaciones (BRANCATO 1987b, 1988, 1989). En 1988, fueron los primeros en acoplarlo a una lámpara de hendidura (BRANCATO 1988). Observaron las lesiones obtenidas a las 24 horas, 10 días y 3 meses post-fotocoagulación. Describieron las alteraciones provocadas en el EPR al utilizar niveles de energía elevados, y señalaron una demarcación zonal en tres áreas concéntricas desde el sitio del impacto: central, intermedia y periférica. Al microscopio óptico, la zona central resulta densa y necrótica mientras que la zona intermedia se caracteriza por la presencia de vacuolas en las células epiteliales y desplazamiento del pigmento. Por último, la zona periférica aparece con células edematosas y disminución de la concentración de pigmento. A medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la fotocoagulación, observaron la presencia de agregaciones de melanina, la pérdida de la nitidez en la clasificación de las áreas así como la presencia de grandes células hiperpigmentadas que reemplazaban a los fotorreceptores necrotizados. Similares hallazgos fueron señalados por Triviño y col. (TRIVIÑO, 1995b, 1997a) quienes describieron la presencia de algunas células de posible origen leucocitario en la superficie vitreorretiniana.

Los autores también apuntan la gran eficacia en la adhesión coriorretiniana que se consigue con las fotocoagulaciones con el láser de diodo. Por ello, es interesante y necesario conocer cómo optimizar este método y comparar los resultados con los obtenidos usando los láseres gaseosos convencionales y en este sentido se publicaron varios trabajos con dos grandes objetivos fundamentales: por un lado, la presencia de acontecimientos fotocoagulativos no deseables y por otro, el estudio de los parámetros (rangos de potencia, tamaño del spot duración y modo de emisión) que resultaran más eficaces y seguros. Se entiende como resultado eficaz el que minimiza el daño a los elementos neuronales y donde es notable la formación de la cicatriz coriorretiniana. Por otra parte, los efectos postfotocoagulativos indeseables consisten fundamentalmente en la presencia de hemorragias, dolor, agujeros retinianos y formación de membranas vitreorretinianas provocadas por la invasión de elementos coroideos en la retina debido a la rotura de la membrana de Bruch.

Uno de los primeros trabajos en este sentido fue Van der Zypen en 1986 (VAN DER ZYPEN, 1986), quien estudió con el láser sólido Nd:YAG, los efectos que se provocan sobre la retina y coroides de conejos pigmentados utilizando emisiones de pulsos diferentes pero con prácticamente la misma energía total liberada. El autor propone que el efecto mayoritario que se observa es de tipo térmico, pero que cuando se utiliza un pico transitorio cargado con el 20% de la energía total, se superpone un efecto mecánico. En este caso, señala un aumento de los casos de rotura de la membrana de Bruch y presencia de macrohemorragias. Similar hallazgo fue destacado por Balles

(BALLES, 1990b) quien propuso entonces, aumentar el tiempo de exposición, para disminuir el número de hemorragias y roturas de la membrana de Bruch.

Smiddy y Hernández (SMIDDY, 1992a) estudiaron los diferentes grados de las lesiones provocadas por la endofotocoagulación con diodo, resaltando el efecto dosis-respuesta entre la cantidad de energía que se emite y la intensidad de las lesiones originadas. Las capas más internas de la retina aparecen con un elevado grado de desestructuración con las quemaduras más intensas, detectándose además algunas roturas en la membrana de Bruch. Estas discontinuidades desaparecen cuando se aumenta el tiempo de exposición en lugar de la potencia de emisión. Un año después, los mismos autores (SMIDDY, 1992b) compararon retinopexia por la fotocoagulación con diodo con la retinocriopexia convencional. Como confirmaron otros autores, la fotocoagulación con el láser de diodo resultó ser el método más eficaz para provocar adhesiones coriorretinianas (DUKER, 1989; MENCHINI, 1992) cualquiera que sea su modo de utilización. Menchini (MENCHINI, 1992), con un enfoque similar, evaluó la eficacia en la retinopexia entre diferentes láseres: argón verde, kriptón rojo y diodo. El estudio de estas lesiones dos meses después reveló que en todos los casos aparecía la formación de una cicatriz pigmentada de adhesión corio-retiniana, resultando ser la más profunda con una destacable atrofia coriorretiniana la obtenida con el láser de diodo, que por su mayor parecido a la obtenida con la criopexia, se asumió como de mayor éxito terapéutico.

Según Brancato (BRANCATO, 1988), la escasa reacción celular estructural que provocaba las fotocoagulaciones con diodo en la superficie vitreoretiniana podría prevenir la aparición frecuente de la vitreoretinopatía proliferativa, efecto secundario frecuente en las fotocoagulaciones. En opinión de algunos autores (ALGVERE, 1990; TSO, 1977), el síndrome vitreo-retiniano proliferativo parece estar relacionado con la desestructuración de la barrera hemato-retiniana (BHR). En este sentido, fueron varios los estudios que destacaron que el láser de diodo produce menos roturas de la BHR que otros láseres de iones (MENCHINI, 1992; SATO, 1992). Sin embargo, hay estudios (LANZETTA, 2006) que muestran, con determinadas intensidades, que la MLI puede resultar alterada por la fotocoagulación con diodo, lo que puede eventualmente provocar lesiones patológicas de la superficie viteroretiniana.

Los estudios comparativos entre el láser de diodo y láseres gaseosos son numerosos, destacando las diferencias entre ambos. Sato en 1992 (SATO, 1992) señaló que la endofotocoagulación con el láser de diodo provoca un menor deterioro del EPR, así como que las trombosis vasculares son más extensas en la coriocapilar y en los vasos de mayor calibre de la coroides, que en los de los ojos tratados con el láser de argón.

De forma similar, se realizaron diversos estudios comparativos para conocer la presencia de hemorragias, otra complicación del tratamiento fotocoagulativo. Obana (OBANA, 1992) estudió la determinación de las potencias umbrales que producen blanqueamiento visible y la aparición de hemorragia coroidea con el láser de argón y el láser de diodo. En su opinión, el láser de diodo tiene

más probabilidad de producir macrohemorragias utilizando los parámetros clínicos (0,1 seg y tamaños de spot mayores de 200 micras), que el láser de argón. Aunque previamente se había postulado que a medida que aumenta la longitud de onda disminuye el riesgo de hemorragia, en este estudio, el autor expuso resultados contrarios estableciendo una relación directa entre la gravedad de la hemorragia y la longitud de onda. En su opinión se debe a dos razones: en primer lugar, el hecho de aumentar el tiempo de exposición, también aumenta el tiempo de convección del calor y, en segundo lugar, la dispersión del calor para longitudes de onda verde, ocurre hacia el interior de la retina, mientras que en el caso del diodo, mayor cantidad de energía pasa a la coroides y, se ha demostrado que la variabilidad en la pigmentación coroidea en los individuos es mucho mayor que en el EPR, lo que dificulta la predicción en relación con la presencia de hemorragias intrarretinianas con rotura de la membrana de Bruch. En este sentido, McHugh, en sus observaciones con MET (McHUGH, 1995) no observó discontinuidades en la membrana de Bruch, aunque señaló el daño térmico que sufrían las fibras de colágeno que la forman.

Para otros autores, (DUKER, 1989; JOHNSON, 1995), el láser de diodo se mostró como el método más seguro para el tratamiento de patologías retinianas con hemorragias intrarretinianas. La longitud de onda infrarroja no sólo penetraba más profundamente en la coroides sino que traspasaba las zonas hemorrágicas retinianas sin provocar ninguna alteración ya que esta longitud no es absorbida por la hemoglobina.

En el 2006, Lanzetta y col, (LANZETTA, 2006), asumiendo la utilidad del láser de diodo, sobre todo para el tratamiento de patologías retinianas en presencia de hemorragias u opacidades pre-retinianas, realizaron un estudio comparativo con tres intensidades distintas (200, 400 y 600mw) utilizando un láser de diodo emitiendo a 670nm y observando las lesiones inmediatamente después de producirse con MO y MET. Según sus resultados, las lesiones provocadas con 400mw, 200mseg y 500μ serían las más óptimas para la clínica. Estas lesiones son visibles oftalmoscópicamente y provocan lesiones fundamentalmente en el EPR y las capas retinianas más externas, con la presencia de un exudado que provoca el desprendimiento de los fotorreceptores del EPR y un ligero edema que alcanza la coroides más interna. Las alteraciones ultraestructurales se limitaban prácticamente a la porción apical de las células del EPR. Sin embargo, cuando la potencia aumentaba a 600 mw, los segmentos externos permanecían adheridos al EPR en el centro de la lesión, mientras que las alteraciones retinianas son mucho más intensas alcanzando capas más internas incluso en los bordes de la lesión. Estas intensas alteraciones se confirmaron ultraestructuralmente, apareciendo algunas células de Müller afectadas y por tanto la MLI. Al igual que otros autores, Lanzetta confirma que el daño principal y primario es de tipo térmico, y que las alteraciones que provoca son relativamente leves y limitadas, pero que estas alteraciones son más intensas cuando se superpone el daño mecánico, posterior en el tiempo al daño térmico, y que aparece con las intensidades mayores.

1.1.5.2.2.- Estudios en primates no humanos

Wallow en 1991 (WALLOW, 1991) estudió las lesiones provocadas en monos *Cynomolgus* a los 2 días, 3 y 9 semanas cuando se aumenta la potencia de emisión, clasificando las lesiones obtenidas como de intensidad leve (grado 1), moderada (grado 2) y aguda (grado 3). Mientras que en las lesiones leves y moderadas, las alteraciones retinianas se situaron en la mitad externa, preservando la retina más interna y las alteraciones vasculares y pigmentarias de la coroides eran muy limitadas y disminuían con el tiempo; en las lesiones agudas, obtenidas con potencias entre 250 y 350mw y diámetros de spot de 300μ, destaca la alteración de la mitad interna de la retina y gran extensión, intensidad y profundidad en las alteraciones coroides, aunque la membrana de Bruch permanecía continua. Después de varias semanas, la cicatriz retiniana implica dos tercios de la retina, de forma que, ciertos daños en la retina interna fueron reversibles. Se resalta el daño de los nervios coroides, edema y pérdida neuronal señalado por la presencia de macrófagos cargados de mielina. En opinión del autor, las lesiones moderadas, de grado 2, serían las ideales para el tratamiento de patologías vasculares, minimizando los daños retinianos y coroides secundarios producidos con potencias mayores. En estas lesiones, obtenidas con diámetros de 100μ y aproximadamente 200mw, se observaron alteraciones en la retina externa con conservación de la retina interna y de la membrana de Bruch. Había oclusión de algunos capilares coroides y agregados de macrófagos dando una imagen de pigmentación globular. La evolución de esta lesión en el tiempo minimizaba los daños de la retina externa. A las 3 semanas, se describe una reparación diferencial de la retina externa con hipertrofia de las células de Müller y proliferación de las células del EPR a lo largo de la membrana de Bruch.

Zuclich y colaboradores (ZUCLICH, 1992) realizaron un estudio comparativo en monos rhesus (*Macaca mulatta*) para determinar los niveles de exposición que se requieren para inducir lesiones hemorrágicas extensas. Se compararon longitudes de onda en el rango amarillo (532nm) e infrarrojo (1064nm) con un diodo Nd:YAG. También se compararon la implicación del modo de emisión, comparando el modo Q-switch con largos o free-running y pulso simple, frente a pulsos repetitivos. Después de describir los tipos de lesiones hemorrágicas originadas y su extensión tanto temporal como espacial, concluyen que la combinación de los parámetros de exposición y los umbrales de hemorragias proveen al clínico de información muy útil para la predicción del riesgo de aparición de hemorragias postfotocoagulación. En su opinión, la presencia de hemorragia está determinada por las características estructurales del tejido que rodea al tejido diana, más que por la intensidad de la emisión del láser utilizada.

1.1.5.2.3.- Estudios en humanos

McHugh en 1990 (McHUGH, 1990) comparó las lesiones obtenidas en la mácula humana a las 18h y 5 semanas postratamiento, con láser de diodo emitiendo a 810 nm y el láser de kriptón mediante la observación con microscopía óptica y electrónica. Con el M.O., las lesiones con el láser

de diodo se situaban en la retina más externa hasta la CPE, y las alteraciones coroideas alcanzaban hasta los vasos medianos. En la retina, las células más afectadas eran las células del EPR y fotorreceptores, así como la glía de Müller a nivel de la CNE. La coriocapilar aparecía alterada aunque la membrana de Bruch presentaba las mayores alteraciones en la zona que rodea al área central del impacto. Por tanto, las lesiones resultaban similares en la retina a las obtenidas con el láser de kriptón y diferentes de las del argón. Los mecanismos reparadores eran visibles a las 5 semanas, resaltando la resolución de las zonas edematosas, parcial recanalización sanguínea y cambios morfológicos en los melanocitos a nivel coroideo. En las cercanías de la membrana de Bruch aparecen células epiteliales proliferativas no pigmentadas, mientras que algunas células del EPR pigmentadas se desprendieron de la membrana de Bruch y aparecen en la retina externa acompañadas de macrófagos cargados de pigmento. En esta zona externa retiniana es notable la pérdida celular y modificaciones morfológicas de los elementos gliales.

Balles 1990 (BALLES, 1990a, b), estudió el efecto del láser de diodo GaAlAs en el tratamiento de enfermedades vasculares retinianas humanas. Destaca dos aspectos importantes comparativamente con los láseres de gases iónicos. Por un lado, para obtener lesiones oftalmoscópicamente similares, se necesitan mayores cantidades de energía emitidas por el láser de diodo en comparación con el de argón, debido a la menor energía asociada, aunque el diodo tiene la ventaja de que atraviesa mejor las opacidades prerretinianas como cataratas o hemorragias retinianas y vítreas. Por otro lado, la mayor profundidad que alcanza la luz emitida en el infrarrojo y rojo penetra más en la coroides donde se encuentran los nervios ciliares, provocando mayores molestias y dolor en los pacientes, como ocurre cuando se utiliza el láser de kriptón rojo.

Vogel en 1992 (VOGEL, 1992) calculó los perfiles en el aumento de la temperatura que se provocan en la retina y coroides humanas con diferentes longitudes de onda (514, 580, 620, 647 y 810nm). Los perfiles en la retina y en la coroides interna resultaron ser muy similares en todas las longitudes de onda, ya que dependían fundamentalmente de la conducción del calor desde el tejido diana donde la energía era absorbida, es decir las células del EPR y los melanocitos coroideos. Sin embargo, para la longitud de onda de 810nm se observó que la coroides externa y media presenta temperaturas más elevadas que con el resto de longitudes de onda. Por ello, el autor desaconseja el uso del láser de diodo (810 nm), con excepción de situaciones muy particulares, como la presencia de hemorragias o el tratamiento de tumores coroideos, que precisan una gran profundidad en la lesión.

1.2.- LA GLIA RETINIANA

1.2.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL A LA GLÍA DEL SISTEMA NERVIOSO

Antes de introducirnos en el estudio de la glía retiniana, es necesario mencionar algunos autores y sus trabajos, que describieron la neuroglía del sistema nervioso y que diseñaron los

métodos de estudio que posteriormente sirvieron para centrarse en el estudio concreto de la glía en la retina, como parte del sistema nervioso.

A partir de la primera descripción de la glía realizada por Virchow en 1846 (WENDELL-SMITH, 1966), las técnicas que se utilizaron para la visualización de la glía fueron varias:

Las técnicas con hematoxilinas de Weigert (ACHÚCARRO, 1913), y modificadas por Da Fano (RAMÓN Y CAJAL, 1913a), teñían específicamente unas fibras neuróglícas. Esto condujo a varios autores (LÓPEZ-ENRÍQUEZ, 1927; PENFIELD, 1924), a pensar que estas fibras eran el único elemento de la neuroglía.

Las técnicas de coloraciones protoplásmicas con anilinas de Held en 1903 (RAMÓN Y CAJAL, 1913a) y Alzheimer en 1910 (ACHÚCARRO, 1913), permitieron observar que estas fibras estaban envueltas por protoplasma, constituyendo por tanto diferenciaciones intraprotoplásmicas. Esta observación hizo que se pensara (ACHÚCARRO, 1913; LÓPEZ-ENRÍQUEZ, 1927; PENFIELD, 1924) en la existencia de una estructura sincitial, que rodeaba a las células nerviosas en el sistema nervioso. Esta descripción sincitial fue un aspecto muy controvertido y condujo al desarrollo de nuevas técnicas de impregnación metálica que tiñeran más intensamente el protoplasma, y que permitieran una discusión más detallada sobre esta estructura.

Las técnicas de impregnación argéntica, aún en uso, que fueron ideadas por Golgi en 1886 y muy utilizadas por Ramón y Cajal a partir de 1889, determinaron una primera e importante etapa de estudio de la neuroglía y, aunque con ellas se lograba una descripción de la morfología general de la neuroglía, las imágenes que se obtenían presentaban una escasa definición (ACHÚCARRO, 1913; RAMÓN Y CAJAL, 1899, 1913a).

Así, los trabajos posteriores que se realizaron con técnicas argénticas perfeccionadas, como el método de cloruro de oro de Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1913a,b) y la técnica del tanino de plata amoniaco de Achúcarro (ACHÚCARRO, 1909, 1910, 1911, 1915) pusieron en duda la existencia del sincitio. Estas técnicas permitieron la observación de las prolongaciones más distales, observando que éstas llegaban a cruzarse, pero en ningún momento formaban una imagen única de fusión o de continuidad, sino que entre ellas aparecían espacios que albergaban los plexos nerviosos y las dendritas.

La técnica del oro sublimado de Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1913a) además de confirmar esta idea, permitió observar nítidamente las últimas prolongaciones de estas células que presentaban unos pies “vasculares” situados sobre los capilares sanguíneos más próximos. Fue en 1913, cuando Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1913b) describió los tres tipos de células gliales en el sistema nervioso:

- La neuroglía fibrosa, astrocitos de largas radiaciones de la sustancia blanca.
- La neuroglía protoplásmica, astrocitos de cortas expansiones propios de la sustancia gris.
- El corpúsculo adendrítico o tercer elemento de Cajal.

La existencia de este tercer elemento, que se correspondía con las células neuróglícas sin expansiones de Nilss, fue controvertida. No fue hasta 1919, cuando Del Río-Hortega (DEL RÍO-

HORTEGA, 1919a, 1919b, 1920, 1921a, 1921b, 1928), con su técnica del carbonato de plata que permitía teñir la neuroglía y el tejido conectivo, realizó un estudio detallado de este corpúsculo adendrítico o tercer elemento, concluyendo que estaba constituido por dos tipos celulares distintos: la microglía y la glía de escasas radiaciones u oligodendroglía.

Así, a principio del siglo XX y, fundamentalmente gracias a los trabajos de la escuela española de neurohistólogos, se finalizó la primera determinación de todos los elementos intersticiales del tejido nervioso y que serían: la neuroglía fibrosa, la neuroglía protoplásmica, la oligodendroglía y la microglía (RAMÓN Y CAJAL, 1913b).

La retina como parte del SNC presenta estos elementos celulares descritos hace un siglo.

La oligodendroglía corresponde a células gliales que rodean y acompañan a los axones mielinizados del sistema nervioso y están ausentes en la mayoría de las retinas de los mamíferos, exceptuando algunas especies como el conejo, donde forma una estructura característica denominada “radios medulares” (Debido a que su estudio no es objetivo de este trabajo, no trataremos esta estirpe glial detenidamente).

La neuroglía, más conocida como astrogía y las células de Müller (tipo glial específico de la retina) constituyen la llamada macroglía, con origen, desarrollo y fisiología totalmente distintas a la última estirpe celular que nos queda por referir: la microglía.

1.2.2.- LA MACROGLÍA DE LA RETINA

La célula o glía de Müller fue descrita por primera vez por Heinrich Müller en 1851, a quien debe su nombre, y que fue uno de los primeros estudiosos de las células gliales de la retina (NEWMAN, 1986b).

La glía de Müller es la estirpe celular glial que más destaca de la retina neural, ocupa casi todo el espesor de la retina, desde la MLI hasta la MLE y se la considera como un tipo especializado de la glía radial (YAMASAKI, 1998).

El cuerpo celular de la célula de Müller se localiza en medio de la CNI de la retina. Un proceso radial se extiende hacia el borde interno de la retina, donde sus terminaciones forman la MLI, en la lámina basal. El segundo proceso radial se extiende hacia la MLE, donde proyecta microvellosidades apicales en el espacio subretiniano, aumentando considerablemente la superficie de la célula. Procesos celulares secundarios proyectados desde el tronco celular, cubren las membranas celulares de las neuronas en todas las capas retinianas. Estas lamelas rodean los haces de los axones de las células ganglionares en la CFNO (NEWMAN, 2001a). La densidad de estas células en la región foveal de los humanos es muy baja (NISHIKAWA, 2001).

La localización de la astrogía, por el contrario, se restringe fundamentalmente a las capas más internas de la retina y según algunos trabajos, se encuentra presente sólo en las especies que presentan una vascularización retiniana, como en los humanos, con la que se relaciona íntimamente. De igual forma, zonas de la retina avasculares, como la fovea en la mácula de los primates, carecen de esta estirpe glial (RAMÍREZ ET AL. 1994, 1996).

1.2.2.1.- Primeras descripciones. Las impregnaciones argénticas y sus modificaciones

En 1782, fue Fontana (POLYAK, 1941) quien observó que en la retina existían, además de los elementos nerviosos periféricos, unas estructuras que formaban un estroma o malla que soportaba a estos elementos nerviosos. Sin embargo, fue Heinrich Müller en 1851 (NEWMAN, 1986b), como hemos indicado anteriormente quien describió la presencia de “fibras radiales” en las retinas de todos los vertebrados.

Un año después, Kölliker además de confirmar las observaciones de Müller, mencionó la presencia de unas células asteriformes en las zonas más internas de la retina. Remak sugirió que estas fibras radiales eran de tejido conectivo pero, gracias a la completa descripción realizada por Schultze en 1866, se confirmó la presencia de una malla constituida por estas células que dejaban huecos entre sí donde se situaban el resto de elementos nerviosos de la retina, describiendo también las dos limitantes retinianas.

Al igual que Kölliker, Schwalbe en 1874 observó unas células neurogliales en la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) (POLYAK, 1941).

Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX y principios del XX cuando, gracias a los estudios de Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1889, 1892, 1904, 1911) y, posteriormente de Dogiel (WOLTER, 1955a), cuando se describieron claramente las fibras de Müller que se disponían unas al lado de otras abarcando desde la MLI hasta la MLE, de forma que sus prolongaciones formaban el soporte para el resto de elementos nerviosos. Fue también en primer lugar Ramón y Cajal, quien determinó a los astrocitos fibrosos como las células neurogliales observadas en la CFNO, que Dogiel había observado en las proximidades de la papila óptica. Según Ramón y Cajal, estos astrocitos se situaban también en la CCG y poseían prolongaciones que alcanzaban hasta la CPI, estando ausentes en el resto de la retina.

Otros autores confirmaron estas observaciones sobre la glía de Müller y los astrocitos, incluso mencionando su presencia en la CPE (POLYAK, 1941).

El estudio de estas células careció de interés hasta que, de nuevo Ramón y Cajal en 1913 (RAMÓN Y CAJAL, 1913a) y posteriormente Del Río-Hortega en sus estudios realizados entre 1919 y 1921 (DEL RÍO-HORTEGA, 1919a, 1919b, 1920, 1921a, 1921b), diferenciaron en el SNC los tres elementos principales de la neuroglía mencionados anteriormente: astroglia, oligodendroglía y microglía.

Basándose en estos trabajos, Marchesani en 1926 (MARCHESANI, 1926) confirmó en la retina, la presencia de estos tres elementos. Según este autor, las células astrogliales se situaban en las proximidades de la papila óptica y en las zonas retinianas más internas, describiendo a las células de Müller, como modificaciones de esta estirpe astrocitaria. Además, la oligodendroglía, que raramente se teñía, poseía prolongaciones cortas que se relacionaban con las células ganglionares y por último, la microglía, que presentaba propiedades ameboides y fagocíticas.

En 1941 Polyak (POLYAK, 1941) confirmó, en un estudio en la retina de primates, la presencia de las fibras radiales de Müller y de la neuroglía accesoria formada por la astroglia fibrosa, protoplásmica y microglía. Polyak describe las astroglia fibrosa en el tejido retiniano semejante a la del resto del SNC, situándola únicamente en la papila, CFNO y la CCG, aunque las prolongaciones

podían alcanzar la CNI, terminando de forma libre. Sin embargo, la astroglia protoplásmica de cuerpo oval o irregular situado en la CPI o en la CCG, presentaba unas prolongaciones en todas las direcciones, cubiertas de espinas y que podían relacionarse con la glía de Müller o con los vasos más próximos. También Polyak describió esta astroglia de morfología intermedia.

Friedenwald en 1952, justo un siglo después de haber sido descrita la glía de Müller, pone de manifiesto la dificultad de una tinción completa de estas células gliales mediante impregnaciones argénticas, explicando así el relativamente escaso número de trabajos publicados al respecto. Scharenberg, en el mismo año, mediante una variante de la técnica de carbonato de plata de Del Río-Hortega, desarrolló un método eficaz para la tinción de la astroglia tanto en su estado normal como patológico. Sin embargo, son los trabajos de Wolter entre 1955 y 1961 (WOLTER, 1955a, 1955b, 1956a, 1956b, 1959, 1961) utilizando una modificación de esta técnica, los que exponen un análisis detallado de los tipos gliales en las diferentes capas de la retina humana. Además de la glía de Müller en la membrana limitante interna, este autor describe a la astroglia como una estructura que separa las neuronas (tejido neuroectodérmico) del tejido conectivo que forma los vasos sanguíneos (tejido mesodérmico) y cuyos cuerpos celulares los sitúa en la CFNO, CCG y CPI.

Las células gliales situadas en la CFNO presentan una morfología bipolar, con un núcleo alargado y dos prolongaciones rectas a ambos extremos que se unen a los axones amielínicos, mientras que las células astrogliales situadas en la CCG y CPI presentaban su clásica morfología estrellada. En la CCG, estas células se podían relacionar con vasos y neuronas y en la CPI formaban una malla irregular, intercalada entre la malla formada por la glía de Müller. En un adulto normal, esta malla formaba una estructura en “panal de abeja”. Las prolongaciones de estas células podían acompañar a los vasos hasta la CNI. También se describieron formas transicionales en las áreas límites entre la CFNO y la CCG. En el resto de capas retinianas no observó la existencia de esta estipe astrogliar, ya que la malla de fibras entrelazadas sin la presencia de ningún cuerpo celular descrita en la CPE era atribuida a la glía de Müller y no a las células astrocitarias.

Un concepto muy importante de este trabajo es la descripción de la “glía perivascular”, determinada como células con el cuerpo celular alargado pegado a la pared del vaso, del que parten numerosas prolongaciones que lo abrazan. Según Wolter, estos elementos parecen estar presentes en todas las zonas vasculares de la retina (WOLTER, 1959), determinando que no existen contactos directos entre las neuronas y los vasos sanguíneos, sino que son los astrocitos quienes mediante unas prolongaciones en forma de “pie vascular” ponen en contacto los vasos con las neuronas. Con esta descripción, se añade a la función de soporte que hasta el momento se otorgaba a los astrocitos, la función metabólica como elemento que comunica células nerviosas y vasos.

En el disco óptico, donde no hay glía de Müller, las células astrocitarias son denominadas “células araña” por su morfología y son astrocitos que sirven de soporte, nutrición y protección a las células ganglionares.

En opinión de Wolter, en los procesos de envejecimiento, esta astroglia disminuye el número de sus prolongaciones gliales, y llega un momento donde el único tipo glial que permanece es la glía de Müller, de mayor resistencia.

Los estudios de Lessell y Kuwabara (LESSEL, 1963) de la neuroglia retiniana de diferentes mamíferos, incluido el hombre, resalta la escasa presencia de astrocitos en la retina y sus notables diferencias con la astrogliá del SNC. Los autores coinciden con Wolter en la descripción de las células bipolares, “lemnocitos”, en la CFNO, situándolas también en la CCG y CPI, mientras que las células de morfología estrellada se presentaban de forma ocasional y no sólo en la CCG, sino también en la CFNO. Consideran, que la glía perivascular de Wolter es exclusiva de humanos, que se localiza en las zonas de la periferia, y que es un rasgo de vejez o enfermedad; es decir, un producto de la degeneración celular. Sin embargo, describen unas células cercanas a los vasos que denominan “paravasculares”, que muestran una o dos prolongaciones y con los cuerpos celulares muy próximos a los vasos.

La existencia de la glía perivascular de Wolter fue un aspecto controvertido y por tanto estudiada por varios trabajos. La mayoría de los trabajos confirmaron su existencia (DAICKER, 1968; ERSKINE, 1963; HONRUBIA, 1970; TRIVIÑO, 1988; WOLFF, 1968, 1970) mientras que otros no la describían. En este aspecto, destacan los trabajos de Odgen (OGDEN, 1974, 1976) que al negar su existencia, pone en duda la supuesta función metabólica atribuida a los astrocitos, por lo que en su opinión, la astrogliá retiniana únicamente tiene una función de soporte.

Las técnicas de impregnación argéntica cumplieron el objetivo de poder observar por primera vez y describir morfológicamente las células gliales, sin embargo por razones inherentes a la técnica como señaló Tolivia en 1975 (TOLIVIA, 1975), los resultados que obtenían distintos autores con la misma técnica resultaban complicados en su comparación, y además, las observaciones morfológicas resultaban poco definidas y no muy específicas. Por ello, los avances en la observación y marcaje selectivo de las células dieron un nuevo enfoque al estudio de la astrogliá de la retina. Aunque en sus comienzos, la utilización de las técnicas inmunohistoquímicas se solaparon con las de impregnación argéntica, poco después y por sí solas caracterizaron otra etapa en la descripción de estas estirpes celulares.

1.2.2.2.- Estudios inmunohistoquímicos

Las técnicas inmunohistoquímicas fueron introducidas por Coons en 1941 (ESQUERDA, 1991), basándose en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo y la capacidad de marcaje de algunos antígenos tisulares con anticuerpos acoplados a trazadores fluorescentes.

Gracias a los estudios de Nakane y Pierce entre 1966 y 1968 (NAKANE, 1966, 1968), y las modificaciones introducidas por Sternberger en 1970 (STERNBERGER, 1970), que desarrollaron un método inmunoenzimático de marcaje celular, aparece la posibilidad de estudiar a las células gliales de forma más específica y selectiva.

1.2.2.2.1.- Generalidades sobre la técnica de inmunomarcaje

Básicamente, la técnica consiste en tres pasos fundamentales (PRIESTLEY, 1987):

1.- Para poder marcar y observar una determinada proteína celular o antígeno tisular, lo debemos unir en primer lugar a un anticuerpo específico, denominado anticuerpo primario y que ha sido obtenido previamente en un determinado animal huésped.

2.- Mediante la inyección del anticuerpo primario del animal huésped en otra especie diferente, obtenemos el anticuerpo secundario. En el tejido a marcar, este anticuerpo secundario se unirá específicamente al anticuerpo primario.

3.- Por último, el antígeno puede ser puesto de manifiesto a través del anticuerpo secundario por dos métodos:

- Método de inmunofluorescencia (PRIESTLEY, 1987): El anticuerpo secundario se conjuga con un marcador fluorescente, y así el antígeno marcado puede observarse con un microscopio de fluorescencia.
- Método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (PRIESTLEY, 1987; STERNBERGER, 1970): Se necesita un anticuerpo terciario o complejo PAP que se obtiene ligando peroxidasa a un anticuerpo contra peroxidasa, desarrollado en la especie del primer animal huésped (donde conseguimos el anticuerpo primario). Por tanto, este complejo se unirá en el tejido a marcar, sobre al anticuerpo secundario y mediante la adición de un cromógeno (generalmente 3,3'-diaminobencidina o DAB) que reaccionará con la peroxidasa expuesta, podremos visualizar al microscopio óptico, la proteína o antígeno tisular objetivo.

La técnica, aunque complicada, muestra buenos resultados; sin embargo el problema estriba en encontrar un marcador que sea exclusivo para la glía. Por ello, numerosos estudios se dedicaron a probar diferentes marcadores gliales para determinar su distribución y eficacia.

1.2.2.2.2.- Marcadores específicos

El desarrollo de anticuerpos frente a antígenos celulares, es una estrategia muy útil para marcar las distintas estirpes celulares. Hasta el momento se ha demostrado la presencia de muchos y variados antígenos en las células macrogiales, pero son relativamente escasos los utilizados más ampliamente. Son de destacar los anticuerpos desarrollados frente a proteínas que forman el citoesqueleto celular, como la proteína gliofibrilar ácida (PGFA), que presenta una alta especificidad para la astrogliá, la proteína S-100 y la vimentina.

También se utilizan los anticuerpos desarrollados frente a neurotransmisores, como es el caso del ácido gamma amino-butírico (GABA), y frente a enzimas como la glutamina-sintetasa, la monoamino-oxidasa o la glucógeno fosforilasa (WIESINGER, 1997).

Otros marcadores ensayados con relativa frecuencia, pero con considerablemente menor especificidad, son los dirigidos frente a las proteínas asociadas a microtúbulos, citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de superficie como proteínas o gangliósidos (RIDET, 1997; YAMASAKI, 1998).

- *Proteína gliofibrilar ácida*

Eng y col. en 1971 (ENG, 1971) consiguieron aislar esta proteína en astrocitos fibrosos de placas de esclerosis múltiple en cerebros humanos. Esta proteína presenta un peso molecular aproximado de 42 KD, y es el constituyente principal de los filamentos intermedios (8-10 nm) de las células astrogliales (DAHL, 1976; LAZÁRIDES, 1980; LESSEL, 1963; UYEDA, 1972).

En 1972, Uyeda, Eng y Bignami (UYEDA, 1972) produjeron anticuerpos específicos contra esta proteína en conejos, observando que reaccionaba con extractos de cerebros humanos normales y patológicos, sin establecer reacciones cruzadas con otros órganos.

La mejora en los métodos de aislamiento de los filamentos del cerebro (DAVISON, 1974), permitió separar proteínas de unos 50 KD, que en un primer momento se identificaron como neurofilamentos, pero que diversos estudios posteriores (LAZÁRIDES, 1980; YEN, 1981) la identificaron como la subunidad constituyente de los filamentos gliales (LIEM, 1978, 1981).

Esta PGFA está evolutivamente bastante bien conservada en los vertebrados (DAHL, 1985, 1986; SASSOE, 1992), y su anticuerpo marca selectivamente las células astrogliales en distintas especies de mamíferos (BIGNAMI, 1972; GHANDOUR, 1979).

A pesar de que se ha encontrado inmunorreactividad positiva frente a PGFA fuera del SNC (ALVAREZ, 1989; BIGNAMI, 1977; BJÖRKLUND, 1984a, 1984b, 1985a; DAHL, 1982; JESSEN, 1980, 1984; RAMÍREZ, 1989, 1990; TRIVIÑO, 1989, 1997b; YEN, 1981), esta inmunorreactividad en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) se restringe a células de Schwann no formadoras de mielina, con filamentos intermedios de 10nm semejantes a los astrogliales del SNC (DAHL, 1982; JESSEN, 1984) y, como demostraron Mokuno y col. (MOKUNO, 1989), con ARNm muy similares.

Fuera del SN, se ha encontrado inmunorreactividad PGFA (+) en el epitelio del cristalino (BJÖRKLUND, 1985b; HATFIELD, 1984) y en los condroblastos de los cartílagos fetales (KASPER, 1990), que se explica por su origen ectodérmico común y por cambios en la expresión durante la ontogénesis, respectivamente.

- *La proteína S-100*

La denominación S-100 proviene de su solubilidad en sulfato amónico al 100% y fue aislada en cerebros de vacas (TERENGHI, 1983).

Parece ser que no se trata de una única proteína, sino de varias proteínas con diferente peso molecular y antigenicidad (MOLNAR, 1985) pertenecientes al grupo de proteínas relacionadas con el calcio, presentando por tanto similitudes con la calmodulina (MATA, 1990).

Su localización es variada, se la ha encontrado en células gliales y en las células de Müller de la retina (BenEZRA, 1987; COCCHIA, 1983), pero también en membranas y núcleo neuronales, en las células de Schwann, en las células de la médula suprarrenal e incluso en algunas células de la hipófisis y células de Langerhans (MADDOX, 1987; MATA, 1990; TERENGHI, 1983; VAQUERO, 1987).

Según Dahl en 1986 (DAHL, 1986), el anti S-100 marcaría mejor que el anti PGFA el cuerpo celular de los astrocitos, aunque peor sus prolongaciones.

- *La vimentina*

Fue aislada de los fibroblastos de embriones de pollo y caracterizada como una proteína constituyente de filamentos intermedios con un peso molecular de 52KD (LAZARIDES, 1980).

Se encuentra bastante conservada a lo largo de la evolución y ampliamente distribuida. Se la ha localizado en las células endoteliales, musculares, fibroblastos, macrófagos, condrocitos, células linfoides y en los primeros estadios del desarrollo astrocitario y epitelial (LAZARIDES, 1980; VAQUERO, 1987).

Los filamentos de vimentina se agrupan en haces que rodean al núcleo como un “anillo”, por lo que se las asume una función de soporte mecánico (LAZARIDES, 1980). Estos filamentos coexisten con los de PGFA en los astrocitos del cerebro, médula espinal, NO y retina (ONO, 1999; CALVO, 1990; DAHL, 1981; ROBINSON, 1989). Hay una transición en el desarrollo, de forma que en el estado embrionario los filamentos son fundamentalmente de vimentina, cuya expresión va disminuyendo a favor de una mayor expresión de PGFA, la cual se expresa mayoritariamente en el adulto (PIXLEY, 1984; QUITSCHKE, 1985; SCHNITZER, 1988a, 1988c).

En situaciones patológicas de tejido nervioso (enfermedad de Alzheimer, de Pick, esclerosis múltiple...), la expresión de vimentina en los astrocitos aumenta considerablemente (YAMADA, 1992).

1.2.2.2.3.- Estudios inmunohistoquímicos de la morfología y distribución de la macroglía retiniana

- *En el conejo*

En 1984, Shaw y Weber (SHAW, 1984) compararon los distintos tipos de filamentos intermedios en la retina de diversas especies animales. Utilizando anti-PGFA no lograron marcar los astrocitos en la retina de los conejos. Diversos estudios con la proteína S-100 mostraron que marcaba selectivamente la glía de Müller en la retina de la rata, cobaya y hámster (COCCHIA, 1983; TERENCEHI, 1983), mientras que en el conejo marcaba también las células astrogiales (MOLNAR, 1985; SCHNITZER, 1987a).

Desde 1985 hasta 1989 (SCHNITZER, 1985, 1986, 1988a, 1988b), los numerosos trabajos dirigidos por Schnitzer mostraron que en la retina del conejo, la glía de Müller y las células horizontales tipo A presentaban una alta inmunorreactividad a la vimentina y se distribuían en toda la retina, mientras que los astrocitos, PGFA (+) y vimentina (+), se localizaban únicamente en la zona de los “radios medulares”, coincidiendo con las áreas vascularizadas (SCHNITZER, 1987b). Esta distribución fue también confirmada por Stone y Dreher (STONE, 1987) y Reichenbach (REICHENBACH, 1987) en sus trabajos publicados el mismo año. Este último autor añadió que la densidad astrocitaria aumentaba en las cercanías del disco óptico.

Para la descripción morfológica, Schnitzer utilizó montajes planos de retina y dividió a los astrocitos PGFA (+) en dos grupos según si se relacionaban principalmente con los axones de las células ganglionares o con los vasos sanguíneos. En el primer grupo aparecía una gran diversidad morfológica entre dos tipos extremos: alargados con gran inmunorreactividad PGFA (+) o estrellados con menor marcaje. Sus prolongaciones se situaban paralelas a los axones de las células ganglionares y ocasionalmente contactaban con los capilares. Este tipo también fue descrito por Stone y Dreher (STONE, 1987). En el segundo grupo, aparecían fundamentalmente dos tipos morfológicos. Aquellos cuyo cuerpo celular se encuentra sobre la pared del vaso envolviéndole con sus gruesas prolongaciones PGFA (+), muy similares a los “perivasculares” de Wolter, descritos con técnicas de plata, (WOLTER, 1986a) y otros con menor marcaje PGFA, morfología estrellada y con el cuerpo celular alejado de los vasos pero emitiendo sus finas prolongaciones hacia ellos. Sin embargo, Stone y Dreher (STONE, 1987) no pudieron confirmar la presencia de la glía perivascular. Triviño, Ramírez y col. en 1992 (TRIVIÑO, 1988, 1990, 1992), utilizando anticuerpos monoclonales frente a PGFA en montajes planos de retina de conejos, confirmaron también la existencia de astroglia únicamente en la retina vascularizada. Diferenciaron los astrocitos que se relacionan con fibras nerviosas y los astrocitos perivasculares relacionados con el sistema vascular. Entre los astrocitos relacionados con los axones de las células ganglionares establecieron tres subgrupos según las características de sus prolongaciones:

- Astrocitos con prolongaciones gruesas, que poseían una elevada inmunorreactividad PGFA (+), cuyas prolongaciones constituían haces.
- Astrocitos de prolongaciones delgadas, con baja inmunorreactividad y morfología estrellada.
- Astrocitos intermedios, con alta inmunorreactividad y morfología entre las dos anteriores.

Entre los astrocitos que se relacionan con los vasos sanguíneos establecieron tres tipos:

- Astrocitos Tipo I: Poseen un cuerpo celular ovoide del que parten numerosos procesos que muestran una alta inmunorreactividad PGFA(+). Se encuentran asociados con vasos de mediano calibre y capilares, equivalentes a los descritos por Wolter (WOLTER, 1956b) y posteriormente por Schnitzer (SCHNITZER, 1985, 1988b) y Robinson (ROBINSON, 1989)
- Astrocitos Tipo II: Tienen una morfología estrellada, su cuerpo celular es esférico muestra un cono basal del que parten de cuatro a diez procesos radiales. Este tipo astrogliar muestra alta reactividad PGFA y se localizan sobre los vasos de mediano y mayor calibre.
- Astrocito Tipo III: Células estrelladas en la que los procesos emergen directamente del cuerpo celular que carece de cono basal. Estos astrocitos presentan una baja señal PGFA (+) y se sitúan entre los capilares. Este tipo celular son las únicas que pueden contactar con otras astrocitos del mismo tipo para formar una red astrogliar.

El mismo grupo investigador (RAMÍREZ, 1997) estudió del mismo modo la morfología y distribución de las células astrogiales en el NO del conejo. Confirmaron la naturaleza astrogial de las limitantes y no apreciaron diferencias significativas entre los astrocitos que forman las limitantes y los que se relacionan con los vasos sanguíneos o con los axones.

Los avances tecnológicos en diferentes áreas de la física (óptica y electrónica), la química y la biología han permitido estudiar la ultraestructura celular confirmando, completando o ampliando los resultados de las observaciones y descripciones previas obtenidas con la microscopía electrónica. En este sentido, la combinación de técnicas de microscopía electrónica y técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas aplicadas muy recientemente está resultando ser una herramienta muy útil. Utilizando estas técnicas Haddad y col (HADDAD, 2001) han confirmado la presencia de astrocitos en las capas más internas de la retina del conejo.

- *En primates no homínidos*

Los estudios inmunohistoquímicos son muy escasos, debido fundamentalmente a las dificultades tanto en el aspecto ético y legislativo como económico.

Schnitzer y col. en sus estudios entre 1987 y 1988 (SCHNITZER, 1987b, 1988a, 1988b, 1988d) compararon la distribución de la astroglia en retinas que tienen un patrón de vascularización diferente. Por una parte, retinas totalmente vascularizadas como las de los monos y por otra, retinas con escasa vascularización como la de los caballos, cobaya y conejos. Destacó que en los monos, los astrocitos se distribuían por toda la retina excepto la fovea (región avascular), mientras que en el resto de especies animales, esta estirpe astrogial aparecía únicamente en las zonas con vasos. Con estas observaciones concluyó que la vascularización retiniana podía ser un factor determinante en la distribución de los astrocitos en la retina. Con relación a las células de Müller, destacaron su elevado contenido en mitocondrias y filamentos intermedios, compuestos por vimentina y PGFA.

En la retina de mono, los cuerpos celulares de los astrocitos se localizan en la CCG y CFNO. Las prolongaciones astrogiales se pueden encontrar alineadas con los axones de las células ganglionares o en contacto con los vasos sanguíneos de las CCG y CFNO. Sin embargo, estas prolongaciones no fueron observadas en la CPI, CNI y CPE a pesar de que hasta estos niveles sí que aparecen capilares.

Diestler y col. en 1993 (DIESTLER, 1993) confirmaron estas observaciones en montajes planos de macacos sometidos a inmunotinción con anti-PGFA. Según sus observaciones, la morfología de los astrocitos varía gradualmente desde formas estrelladas situadas en la periferia hasta formas más bipolares localizadas en las proximidades del disco óptico. La forma estrellada se conserva en toda la retina para la astroglia localizada en la CCG. De forma similar a las observaciones de Schnitzer, confirman los contactos con los vasos y con los axones de la CFNO.

- *En la especie humana*

Kumpulainen y col. en 1983 (KUMPULAINEN, 1983) situaron los cuerpos astrogiales PGFA (+) en la CCG, extendiendo sus prolongaciones hasta la CPI. Un año después, diversos estudios situaron tanto los cuerpos celulares como las prolongaciones astrogiales no sólo en la CCG sino también en la CFNO rodeando a los vasos sanguíneos (HISCOTT, 1984; TUCCARI, 1986), mientras que otros (MOLNAR, 1984) sitúan la tinción PGFA (+) únicamente en la CFNO.

Ramírez, Triviño y col. en 1993 (RAMÍREZ, 1994; TRIVIÑO 1997b) posteriormente a sus trabajos en los conejos ya señalados anteriormente, estudiaron las retinas humanas. De sus trabajos se destaca que no observaron la presencia de los astrocitos perivasculares descritos por Wolter en la retina humana. Según la morfología que presentaban, diferenciaron dos tipos de astrocitos:

- Astrocitos de morfología alargada localizados en la CFNO. Sus procesos astrocitarios formaban haces que se situaban a lo largo de los haces de fibras nerviosas separándolos entre sí.
- Astrocitos estrellados encontrados en la CCG. Los procesos que emiten se dirigen hacia otros astrocitos estrellados y hacia los vasos sanguíneos formando una malla con forma de panal. Este tipo astrogial envía procesos hacia la CNI, donde forma un plexo irregular que acompaña a los capilares que vienen de la CCG y se extienden hasta la CNI. Los cuerpos celulares situados en la CCG, se pueden agrupar a modo de racimos celulares.

Este mismo grupo (TRIVIÑO 1996) estudió también la morfología y distribución de astrocitos marcados con PGFA en el NO humano, relacionando la intensidad del marcaje frente a PGFA, con la cantidad de filamentos intermedios y su implicación funcional. Así, los astrocitos con mayor intensidad del marcaje, poseen mayor cantidad de filamentos y su función fundamental es estructural, aislando y protegiendo los axones, así como formando las membranas limitantes. En el caso de los astrocitos con poco marcaje y menor cantidad de filamentos se les presume un papel organizador de los axones neuronales antes de salir al NO.

Posteriores estudios del mismo grupo (TRIVIÑO, 2000) compararon estos tipos morfológicos encontrados en adulto con los encontrados en un niño de 18 meses. Los astrocitos alargados aparecen más estilizados y de mayor longitud en el adulto que en el niño. En éste último, la malla en forma de panal no está totalmente desarrollada. Además, en el niño aparecen numerosos cuerpos celulares sobre los vasos sanguíneos, mientras que en la retina del adulto, éstos son muy escasos. De sus observaciones, concluyeron que a esta edad postnatal, ni la morfología ni la distribución de los astrocitos de la retina están finalizadas.

1.2.2.3. Estudios ultraestructurales

Estudios utilizando la microscopía electrónica confirmaron la presencia de astrocitos en la CFNO y CCG (IKUI, 1976) y la localización de sus prolongaciones hasta la CNI y CPI (WEIDMAN,

1973), así como la ubicación de los astrocitos en las zonas vascularizadas de la retina (IKUI, 1976; POLYAK, 1941) manteniendo en algunos casos contactos con las paredes vasculares (HOGAN, 1971; IKUI, 1976; RHODES, 1984; VILLEGAS, 1964).

Algunos de estos trabajos determinaron las características ultraestructurales de estos astrocitos de la retina humana. Presentan un núcleo esférico u oval con abundante heterocromatina y un citoplasma con partículas de glucógeno y gran cantidad de orgánulos, entre los que aparecen finos y numerosos filamentos (aproximadamente 60 nm) (HOGAN, 1963, 1971; Kuwabara en 1961 (48 de NEWMAN, 2001a); IKUI, 1976). Sus prolongaciones pueden ser irregulares ocupando los espacios entre neuronas o dispuestas paralelamente formando haces que pueden entrecruzarse formando una malla (IKUI, 1976). Estas prolongaciones pueden contactar entre sí mediante desmosomas. Algunos cuerpos celulares aparecen sobre la superficie de las paredes vasculares, aunque a nivel ultraestructural no destacan ninguna diferencia entre éstos y los dispuestos más alejados de los vasos sanguíneos (HOGAN, 1963, 1971; IKUI, 1976).

Los estudios ultraestructurales en la morfología de las células de Müller destacan la estrecha relación de sus proyecciones celulares con los cuerpos neuronales. Ramírez y col. en 1996 (RAMÍREZ, 1996) destacan la relación entre astrocitos y células de Müller mediante uniones tipo gap en la CFNO y CCG. Las terminaciones de estas proyecciones alcanzan tanto la MLI como los vasos sanguíneos de la retina superficial. Los vasos sanguíneos de la CNI están rodeados por procesos celulares adicionales. (RASMUSSEN 1972, 1973; REICHENBACH, 1988- 91,92 y 96 de NEWMAN, 2001a).

1.2.2.4.- Funciones de la macroglía

Durante mucho tiempo se pensó que la glía funcionaba como un elemento inactivo en la retina. Los cada vez más numerosos estudios sobre la fisiología de las diferentes estirpes gliales han mostrado sus numerosas e importantes funciones tanto en el desarrollo, en la transmisión de la información o en la respuesta frente a lesiones del tejido nervioso.

1.2.2.4.1.- Sostén del tejido nervioso

Una de las primeras funciones que se atribuyeron a la macroglía, tanto a los astrocitos como fundamentalmente a las células de Müller, fue la de sostén o soporte dentro de la compleja citoarquitectura retiniana, debido a su localización y a su amplia distribución (ACHÚCARRO, 1913; RAMÓN Y CAJAL, 1913a, 1913b; WENDELL-SMITH, 1966).

Las células astrogliales ocupan una cuarta parte del volumen total del tejido nervioso y se organizan en dos niveles: Por un lado son los responsables de separar los axones en fascículos, formando una red que recubre todas las superficies del tejido nervioso de forma ininterrumpida. Por

otro lado, sus prolongaciones cortas rodean las superficies receptoras de las neuronas y las zonas sinápticas entre ellas. Estos dos niveles consiguen asegurar una transmisión nerviosa selectiva, sin difusión de la información (KUFFLER, 1976; SOLÉ, 1992; WOLFF, 1970).

La importancia de estas células es destacada por Wolburg (WOLBURG, 1991) quien en sus estudios en embriones de pollo, otorga la responsabilidad de la formación de la citoarquitectura en capas de la retina a las células del EPR y a la lámina basal, siendo estas estructuras responsables de la diferenciación final de las células de Müller, las cuales en su opinión determinan el orden radial y espacial del resto de las células retinianas.

Schütte en 1998 (SCHÜTTE, 1998a) demostró en las retinas de mamíferos que las células de Müller y los astrocitos se encuentran acoplados entre sí a lo largo de todo el patrón visual mediante uniones gap. En este estudio se demostró la presencia de la conexina 50, proteína presente en las uniones tipo gap que aparecía en las terminaciones de los pies de las células de Müller y los procesos filamentosos entre los fotorreceptores. También fue detectada en los astrocitos del NO y en las proyecciones intrarretinianas.

1.2.2.4.2.- Modulación del metabolismo y actividad neuronal

- **Metabolismo energético**

El Sistema Nervioso presenta un gran consumo energético en comparación con el resto del organismo y son ampliamente conocidas las graves consecuencias que pueden ocurrir en el organismo provocadas por las alteraciones de los niveles de glucosa en sangre. En este aspecto, los astrocitos desempeñan un importante papel, ya que debido a su estratégica localización y amplia distribución además de su versatilidad metabólica puede poner a disposición de las células nerviosas, distintas moléculas como fuentes de energía (WIESINGER 1997).

Aunque los astrocitos prefieren a la glucosa como fuente energética, son capaces de utilizar otros monosacáridos. La glucosa y la manosa pueden ser almacenadas en el interior celular en forma de glucógeno, liberando glucosa cuando se precise (RIPPS, 1985; WIESINGER 1997). Los estudios de varios autores recogidos en la revisión de WIESINGER 1997 (WIESINGER 1997) han confirmado la predominante localización de glucógeno en astrocitos de cerebro de mamíferos y en las células de Müller y astrocitos de la CFNO. La ruta más utilizada para la obtención de energía es la glucólisis anaerobia, de forma que el lactato generado es el producto metabólico más importante de los astrocitos, parece ser que en forma de ácido láctico. Por tanto, parece ser que los astrocitos son el tipo celular gluconeogénico desde el SNC, a través del ácido láctico. Se piensa que los objetivos son por una parte, tamponar y controlar la osmolaridad del fluido extracelular y por otra, reciclar el lactato generado por las células vecinas. Por otro lado, son capaces de transformar el dióxido de carbono generado por la actividad neuronal en bicarbonato que pueda ser eliminado. Esta reacción se lleva a

cabo por la anhidrasa carbónica (AC), enzima presente en las células gliales (KUMPULAINEN, 1980; MUSSER, 1973; NEWMAN 2001a).

Este papel antioxidante está apoyado por el estudio de Schutte (SCHUTTE, 1998) que ha demostrado que en situaciones de hipoxia, el glutatión puede transferirse de las células de Müller hacia la neurona. Teniendo en cuenta el papel antioxidante de esta molécula, este hecho podría explicar la resistencia de las neuronas de la retina frente a una situación de isquemia-reperfusión.

- **Metabolismo de neurotransmisores**

Los neurotransmisores son moléculas que son liberadas por los axones neuronales durante la sinapsis, al espacio intercelular denominado específicamente "hendidura sináptica" como resultado de la actividad neuronal de transmisión de la información.

Tanto en las membranas de las células de Müller como en las de los astrocitos, se ha demostrado la presencia de receptores para una gran variedad de neurotransmisores. Si estos receptores resultaran ser funcionales y pudieran ser activados por los neurotransmisores, implicaría que estas células gliales podrían participar en los procesos de transmisión sináptica.

Los trabajos dedicados en este sentido son muchos y los receptores más estudiados han sido frente al glutamato y GABA, pero también se han demostrado receptores frente a neurotransmisores adrenérgicos, purinérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos y otras sustancias como la somatostatina, sustancia P o ANF. Estos receptores no sólo se han detectado "in vitro" sino también "in vivo" y en algún caso hay evidencias de que son funcionales, como en el caso del glutamato y GABA, lo que sugiere que pueden ser activados por neurotransmisores liberados por las neuronas, por lo que podrían participar directamente en los procesos de transmisión de la información. Por otra parte, la especial localización de estos receptores fuera de la hendidura sináptica apoya la idea de la existencia de transmisión extra-sináptica y la posible comunicación entre astrocitos y neuronas por la vía clásica de liberación de neurotransmisores (PORTER 1997; NEWMAN 2001a).

Son muchos y variados los efectos que provoca en los astrocitos la estimulación de estos receptores por los neurotransmisores liberados por los terminales nerviosos. Se pueden destacar las alteraciones en la regulación del metabolismo astrocitario, de la toma del glutamato o del volumen extracelular, así como en la participación en el desarrollo y recuperación del tejido nervioso. Un efecto secundario derivado de la presencia de receptores frente a diversas sustancias en la superficie de estas células gliales es el de protección de las neuronas frente a productos neurotóxicos, como son los neurotransmisores, entre los que podríamos destacar al glutamato (DYAN, 1991).

El glutamato es un neurotransmisor excitatorio, y se ha demostrado que el aumento de su liberación está relacionado en la etiología de la muerte de las células nerviosas. La distribución y localización de los receptores GLAST y GLT-1 están relacionadas con la capacidad y necesidad de

captar glutamato por parte de estas estirpes gliales. El complejo metabolismo del glutamato depende de varios factores, como puede ser la disponibilidad de amoníaco o energía (SONNEWALD, 1997). Si hay energía suficiente, el glutamato puede ser metabolizado en glutamina y amoníaco, (LAM, 1980; MARSHALL, 1974) gracias a la glutamina sintetasa. El acúmulo de glutamina en el interior celular de los astrocitos se ha relacionado con el edema celular observado en situaciones especiales. La glutamina puede ser difundida hacia las neuronas de nuevo transformándose en GABA y glutamato (NORENBERG, 1979; RIEPE, 1977; LIETH, 2001).

Un fenómeno similar ocurre con la serotonina (KIMELBERG, 1985), neurotransmisor que regula la actividad funcional y la expresión de las proteínas del citoesqueleto del astrocito (LE PRINCE, 1990). Otros neurotransmisores susceptibles de ser modulados por los astrocitos son la glicina (SATO, 1991), el 3H-L aspartato (LÓPEZ-COLOMÉ, 1991) o la taurina (LAKE, 1992a, 1992b, 1992c).

No sólo resultan neurotóxicos la acumulación de neurotransmisores, sino también la de productos de desecho que son generados por la elevada actividad de las células del tejido nervioso. Los niveles de urea pueden ser controlados por los astrocitos ya que se ha demostrado que estas células presentan una elevada expresión del transportados UT3 (BERGER, 1998). Por otra parte, se ha sugerido que la mayor acumulación de aminoácidos libres en el interior de los astrocitos con respecto a las neuronas que presentan una elevada síntesis proteica, parece ser que indican su papel regulador de esta actividad celular controlando el sustrato (BLOMSTRAND, 1970; HAMBERGER, 1971).

- **Metabolismo iónico**

La entrada de estos neurotransmisores a través de la membrana altera diferentes canales iónicos. La presencia de canales iónicos en la membrana glial sugiere que estas células están implicadas en el control iónico tanto del interior celular como del espacio intercelular. Por tanto, si estos canales se activan, son capaces de modificar la concentración iónica en el espacio intercelular donde se encuentran las neuronas lo que implica que puede existir una comunicación glio-neuronal, ya que la células gliales son capaces de modular la actividad eléctrica de las neuronas de la retina, participando por tanto directamente del procesamiento de la información del SNC (NEWMAN 1998, 2001a, b).

En este sentido, se ha demostrado la presencia de canales de sodio (BREW, 1987) y potasio (RIPPS, 1985; TRACHTENBERG, 1970) en las células astrogiales y células de Müller. Este hecho sugiere que estas células gliales pueden participar en la reposición y mantenimiento del potencial de reposo neuronal, evitando por tanto una despolarización continua y de zonas adyacentes (FRIEDE, 1970; KARWOSKI, 1989; NEWMAN, 1984a, 2001a; ORKAND, 1973; RIPPS, 1985; TRACHTENBERG, 1970; WENDELL-SMITH, 1965). Diversos estudios han mostrado que la permeabilidad al potasio es mayor en las terminaciones en pie vascular de las células astrogiales

(BREW, 1986; NEWMAN, 1984b, 1985a, 1985b, 1986a, 1986b, 2001a) y parece ser que en esta zona se elimina hacia los vasos sanguíneos el exceso de potasio capturado (PAULSON, 1987). Por otra parte, parece que la captura masiva del potasio tras la activación neuronal es una señal de activación del metabolismo del glucógeno (PENTREATH, 1982).

Además de los detallados anteriormente, se han encontrado canales para el calcio, cloro, bicarbonato, etc... (BERWALD-NETTER, 1986; McVICAR, 1991; NEWMAN, 1985b, 1999; RITCHIE, 1992) y sistemas de transporte ácido-base que pueden regular tanto el pH intracelular como extracelular (NEWMAN, 1999, 2001a). No sólo se han observado la presencia de canales iónicos, sino también se ha demostrado que la membrana de los astrocitos y las células de Müller presenta un alto contenido del canal proteico acuaporina-4, encargado de la permeabilidad al agua, lo que sugiere que estas células están implicadas en el mantenimiento de la presión osmótica de diferentes estructuras oculares como la retina y el NO.

En resumen, los astrocitos y la células de Müller no sólo reestablecen el equilibrio iónico y de neurotransmisores después de la activación neuronal (DYAN, 1991) sino que parecen estar implicados directamente en ella, manteniendo el potencial de reposo y modulando las propiedades de excitabilidad y transmisión de las neuronas (RANSOM 1996 del SCHÜTTE 1998; NEWMAN, 1998, 2001a).

1.2.2.4.3.- Participación en el desarrollo y crecimiento del tejido nervioso

La participación de la glía como guía de las neuronas durante el desarrollo del Sistema Nervioso ha sido demostrada por diferentes estudios. Son de destacar los trabajos de Rakic entre 1971 y 1981 (RAKIC, 1971, 1981) quien observó que la presencia de glía radial y su interacción con las neuronas proporcionaban un camino en la migración de éstas últimas, sentando las bases de la compartimentación del tejido nervioso en desarrollo. Según Lauder en 1986, (LAUDER, 1986), cuando este proceso finaliza, la glía radial se transforma en astroglia u oligodendroglía. Actualmente, se ha observado que las células de Müller durante el desarrollo migran proximalmente y extienden sus procesos hacia los márgenes retinianos más internos y externos. Estos procesos radiales sirven de guía para las neuronas durante el desarrollo retiniano posterior (NEWMAN 2001a).

Diversos estudios (THANO, 1990; NEWMAN, 2001a), han señalado que los precursores celulares de astroglia, los propios astrocitos y las células de Müller pueden secretar una serie de factores de crecimiento que influyen en la supervivencia, crecimiento y diferenciación neuronal y vascular. Entre ellos, podemos nombrar el factor de crecimiento neuronal (VACA, 1992) o proteínas de superficie y constituyentes de la matriz extracelular (MEC) como la laminina o fibronectina, que favorecen y estimulan el crecimiento de las prolongaciones neuronales en el SNC (LAUDER, 1986) en el NO del ratón (LIESI, 1988) o en primates (PROVIS, 2000). En estudios "in vitro", Sakuray et col. en 1998 (SAKURAY, 1998) han demostrado que la maduración de los precursores de

oligodendrocitos ocurre en diferentes estadios y está controlada por la presencia e interacción de astrocitos.

Los estudios en 1999 de Zhang en ratas (ZHANG, 1999) y Sandercoe en humanos (SANDERCOE, 1999) han relacionado la implicación de las células astrocitarias en el desarrollo y formación de los vasos sanguíneos. Éste último muestra que mientras que no aparece proliferación microglial, los astrocitos sufren una elevada proliferación que acompaña al desarrollo de los vasos en su migración a lo largo de la retina fetal.

Por tanto, tanto la morfología de una neurona como su modelo de ramificación de dendritas y axones están determinados por una combinación de factores intrínsecos y extrínsecos o ambientales. La relación entre astrocitos y neuronas es tan estrecha que en opinión de Gargini (GARGINI 1998), la morfología de los astrocitos en la retina de mamíferos está influida por la de los axones de las células ganglionares cercanos. Según su estudio, aunque el mecanismo subyacente es desconocido, la señal es liberada por el desencadenamiento de la actividad neuronal durante el desarrollo.

1.2.2.4.4.- Formación de la barrera hemato-encefálica y hemato-retiniana

La barrera está formada por un sistema celular complejo formado por células endoteliales, pericitos, microglía perivascular y astrocitos. Aunque la función de barrera la realizan las células endoteliales, el resto de funciones especiales se debe a la interacción de todas las células que la forman (GOLDSTEIN, 1986; RISAU, 1990). Las células endoteliales de los capilares del cerebro y de la retina poseen unas características morfológicas y bioquímicas especiales diferentes de las de otras células endoteliales del cuerpo. Estas células endoteliales “especiales” están conectadas entre sí por uniones estrechas, estructura responsable de la función de barrera (ABBOTT, 1987; BRIGHAN, 1969; GOLDSTEIN, 1986; STEWART, 1986).

Entre las numerosas funciones que posee la BHR, se pueden destacar la protección del tejido nervioso de moléculas o sustancias neurotóxicas, que se encuentren en una concentración más elevada en la sangre que en el espacio extracelular (RISAU, 1990), y la contribución al mantenimiento de la homeostasis del microambiente neuronal, mediante el control del intercambio de sustancias entre la sangre y tejido nervioso o de su metabolismo, gracias a unos sistemas transportadores específicos (GOLDSTEIN, 1986; STEWART, 1986).

Son muchos los trabajos que han confirmado el papel primordial de los astrocitos en la inducción y mantenimiento de las propiedades de la BHR (IGARASHI, 2000; JANZER, 1987; RISAU, 1990). Parece ser que los astrocitos están implicados en la formación de las uniones estrechas de las células endoteliales características de la formación de la barrera, bien por factores de liberación o bien por su íntima relación con las células endoteliales (ALLT, 1997; WOLBURG, 1999; DYAN, 1991;

PENFOLD, 1990; PROVIS, 1991). Diversos estudios señalan a unos sistemas de partículas ortogonales de alta densidad, constituidos por canales proteínicos que transportan iones como K^+ (RISAU, 1990) o de moléculas como el agua (NAGELHUS, 1998; WOLBURG, 1999) con gasto de energía detectado por la presencia de la Na^+/K^+ ATPasa (NEWMAN, 1986a, 1986b; RICHTER, 1990; RIPPS, 1985; RISAU, 1990). Además, los astrocitos secretan factores solubles inductores de las propiedades de barrera en las células endoteliales de tejidos de origen no nervioso (IGARASHI, 2000; JANZER, 1987; LOBRINUS, 1992; STEWART, 1981).

1.2.2.4.5.- Participación en los procesos patológicos del Sistema Nervioso

La implicación de la glía con diversos procesos patológicos del SN puede ser estudiada en dos sentidos. Por una parte, la respuesta de estas estirpes celulares frente a una alteración o daño en el Sistema Nervioso. Por otra, podemos señalar la implicación de las diversas funciones metabólicas de los astrocitos en algunas patologías y desórdenes nerviosos de gran importancia.

- **Respuesta glial frente al daño neuronal**

La reparación de una herida y remodelación de la matriz extracelular (MEC) en el SN implica varios tipos celulares, que incluye astrocitos "reactivos", microglía, células endoteliales, macrófagos invasores y oligodendrocitos que contribuyen a la formación de una cicatriz glial (CLARKE, 1998; HERNÁNDEZ 2000; HIRSCH, 1999; LINDSAY, 1986).

Después del daño neuronal, los astrocitos "reactivos" sintetizan proteínas de la MEC (que se expresan en altos niveles únicamente durante el desarrollo) que remodelan el microambiente del tejido neural, proveen de envueltas que aíslan las neuronas dañadas, previenen la migración de células inflamatorias desde la dañada BHE, y sirven de lugar de almacenamiento de factores de crecimiento que determinan la regeneración de axones del SNC después del daño (FITCH 1997 en HERNÁNDEZ 2000).

Estos astrocitos "reactivos" hipertróficos, presentan otras alteraciones morfológicas en comparación con los astrocitos "normales", como un aumento del número de prolongaciones y filamentos gliales o una mayor actividad metabólica (COOK, 1973; DUSART, 1991; KIMELBERG, 1989). Esta hipertrofia de los astrocitos "reactivos" se observa como un aumento en la expresión y marcaje de la PGFA u otros marcadores específicos como Mab J1-31, M22 y 6.17 que reconocen filamentos intermedios y la sobre-expresión de genes como c-fos, Hsp-27 relacionados con la proliferación. Una vez que la cicatriz glial está formada, los niveles de PGFA disminuyen en el lugar del daño y los astrocitos se convierten en quiescentes (HERNÁNDEZ 2000).

Esta proliferación astrogliar se ha comprobado que puede ser inducida por sustancias presentes en el tejido sano (NIETO-SAMPEDRO, 1985) o por una serie de factores liberados bien por neuronas (FRUTTIGER, 2000) o bien por otra estirpe glial, como la microglía (GIULIAN, 1985;

HANISCH 2002) en respuesta al daño neuronal. Durante algún tiempo se consideró esta gliosis astrocitaria como un impedimento para la regeneración axonal, sin embargo diversos trabajos revisan este hecho y discuten el posible papel de estos astrocitos en determinados casos de daño nervioso.

En opinión de Ridet (RIDET 1997), no sólo la formación de la barrera glial alrededor de la zona lesionada parece ser ventajosa, por el simple hecho de aislar el tejido sano de la posibilidad de daños indirectos, sino que parece que estos astrocitos reactivos, proporcionan un sustrato que favorecen la extensión neurítica. La posibilidad de ofrecer este sustrato está relacionada con la localización de la gliosis y con la estructura de la cicatriz glial originada, aspectos determinados por muchos factores como citokinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y otras señales.

Sin embargo, parece ser que, como ocurre con la microglía activada sin regulación, la presencia de estos astrocitos reactivos puede contribuir a la patogénesis de algunas alteraciones neurodegenerativas en humanos como la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, demencia del SIDA y daño agudo. Como igualmente ocurre con la microglía, el origen de estos astrocitos "reactivos" resulta controvertido, ya sea de precursores gliales (astroblastos) o de astrocitos pre-existentes.

- **Patogenicidad por alteraciones metabólicas**

La Enfermedad de Parkinson se desencadena por una muerte de neuronas dopaminérgicas provocada por la aparición de sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno y radicales oxidotóxicos. La enzima glutatión peroxidasa, presente en la astrogliá, protege a las células frente a esta toxicidad, por lo que un aumento en los niveles de esta enzima astrocitaria tendría una función protectora en las neuronas (DAMIER, 1993).

Ya hemos señalado, que los astrocitos están implicados en el proceso de aclaramiento del exceso de glutamato extracelular porque presentan receptores para este neurotransmisor. Cuando disminuye el número de estos receptores se produce un aumento del glutamato extracelular relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la ELA. Además, el aumento de la duración del glutamato en el espacio sináptico desencadena una hiperexcitabilidad neuronal, relacionada con la epilepsia (PORTER 1997).

Durante un proceso isquémico además de la hipoxia consiguiente, a nivel bioquímico se produce una inhibición de la entrada de glutamato en el astrocito, la acumulación de este aminoácido excitotóxico en el medio extracelular desencadena la muerte neuronal (VIBULSRETH, 1987). Este hecho provoca una hinchazón astrogliá y posteriormente una proliferación astrocitaria activada por la liberación de factores de crecimiento, así como una mayor actividad metabólica detectada por el aumento de las mitocondrias, del retículo endoplásmico y del volumen nuclear astrocitario (DYAN,

1991; OHIRA,1990). Se ha demostrado que los astrocitos son más vulnerables frente a la hipoxia que las neuronas, tal vez porque son los encargados de la protección neuronal como hemos señalado anteriormente. Por otra parte, son capaces de liberar glucosa en perjuicio de su supervivencia; proceso por otra parte admisible ya que los astrocitos pueden proliferar y migrar, mientras que los posibles efectos sobre las neuronas son de mayor irreversibilidad (CHANG-LING, 1992).

En este sentido, parece ser que la hipotermia moderada reduce el daño producido por la isquemia ya que inhibe la liberación temprana de neurotransmisores excitadores, retrasando la activación astrocitaria y necrosis neuronal (CHEN, 1992).

1.2.3.- LA MICROGLÍA DE LA RETINA

1.2.3.1.- Primeras descripciones. Las impregnaciones argénticas y sus modificaciones

En 1875, Eichhorst (DEL RÍO-HORTEGA, 1919a, 1920) trabajando con médula espinal de fetos humanos describió unas células neurogliales embrionarias, que emergían de los vasos sanguíneos y se introducían en la médula espinal, donde se transformaban en los denominados corpúsculos granuloadiposos. Posteriormente, sufrían otra transformación y se localizaban alrededor de las fibras nerviosas emitiendo unos procesos citoplasmáticos.

En similar tejido celular, Hiss en 1890, observó unas poblaciones celulares de núcleo pequeño y oscuro provenientes de la piamadre y sus redes vasculares y que penetraban tanto en la sustancia blanca como en la gris con movimientos ameboides. Estas células, posteriormente fueron también descritas por Capobianco y Fragnito, denominándolas “células ameboides del tejido conectivo de origen mesodérmico” (MARTÍN, 1989; PENFIELD, 1924).

Robertson en 1900 (ROBERTSON, 1900) describió en el cerebro, unos elementos más pequeños que la astroglia con algunas expansiones surgiendo de su escaso citoplasma, que denomina “células mesogliales” asignándolas un origen mesodérmico, a diferencia de la “células neurogliales” de origen neuroectodérmico. En el año anterior, 1899, Ramón y Cajal (RAMÓN Y CAJAL, 1899) había realizado un primer estudio extenso sobre la neuroglía en el cual no referenciaba ningún tipo de mesoglia o elemento similar. Sin embargo, fue este mismo autor Santiago Ramón y Cajal, quien en 1913 (RAMÓN Y CAJAL, 1913b), describió ciertas células pequeñas y adéndricas como el “tercer elemento de los centros nerviosos” cuya existencia levantó mucha controversia.

Mientras unos autores como Bevan, Lewis, Nissl, Robertson, Bonome, Schaper o Rosental defendían la existencia de la glía germinal, indiferente, exenta de expansiones, coincidiendo con Ramón y Cajal; otros autores como Held, Alzheimer, Friendt, Jakob y Lugaro entre otros, aludían a su falta de ramificaciones como deficiencias técnicas y que por tanto en realidad debían ser

ramificadas como el resto de elementos neurogliales descritos (LÓPEZ-ENRÍQUEZ, 1927; MARTÍN, 1989; RAMÓN Y CAJAL, 1913b). En este sentido, los trabajos de la escuela española encabezada por Achúcarro (DEL RÍO HORTEGA, 1919a, 1920) abogaron por la existencia de unas células distintas pero de origen mesodérmico común, y cuyas funciones eran la eliminación de productos de desintegración (ACHÚCARRO 1908, 1910, 1911, 1915). Así mismo, Ramón y Cajal con los resultados que obtuvo mediante la coloración aúrica, no sólo insiste en la existencia de este corpúsculo indiferente, redondo, apolar y abundante en la sustancia blanca, sino que los clasifica según su localización como: en torno a las neuronas (satélites apolares), junto a las células neuróglícas (satélites de la glía), en el itinerario de los vasos (satélites perivasculares) y formando parte de la sustancia blanca (paquetes o columnas celulares), donde es más abundante. En esta última localización distingue distintas variedades dependiendo de su tamaño y apariencia. Algunas ameboides eran parecidas a las descritas por Alzheimer y otras se mostraban más similares a las de Schwann del sistema nervioso periférico. A cada clase les atribuía por tanto una actividad distinta, suposición que luego confirmaría del Río Hortega (RAMÓN Y CAJAL, 1913b, 1920; DEL RÍO HORTEGA, 1919a, 1919b, 1920).

Las afirmaciones de Ramón y Cajal fueron confirmadas por muchos investigadores (Achúcarro, Gayarre, Schaffer, Lafora, Ziveri, Río-Hortega, Fañanás, Havet, Fortún, Rossi, Castro), quienes a pesar de no aportar ningún detalle relevante a lo previamente descrito por Cajal, contribuyeron en su conjunto al aumento del conocimiento de la neuroglía tanto normal como patológica (MARTÍN, 1989). A partir de 1919 Pío del Río-Hortega (DEL RÍO HORTEGA, 1919), discípulo de Achúcarro, realizó una serie de trabajos en cerebro y cerebelo con la técnica del carbonato de plata amoniacal, distinguiendo dentro del tercer elemento de Cajal un nuevo tipo neuróglíco al que denomina “microglía” por su pequeño tamaño. Este hecho constituyó toda una revolución de los conceptos establecidos hasta el momento, ya que demostró dos hechos fundamentales: que el tercer elemento apolar o adendrítico de Cajal ni era un sólo elemento ni era apolar.

En 1920, en un extenso estudio morfológico, estructural, fisiológico y de distribución de la microglía de Del Río-Hortega (DEL RÍO HORTEGA, 1919c, 1920), el denominado hasta entonces tercer elemento, siempre aparecía dotado de expansiones, estableciendo además notables diferencias entre el tercer elemento dominante en la sustancia blanca y el residente en la sustancia gris, de forma que la microglía se localizaba fundamentalmente en la sustancia gris y nos anticipaba la existencia de la “oligodendroglía o glía de escasas radiaciones”(DEL RÍO HORTEGA, 1921), anteriormente denominada glía interfascicular, que se localizaba en la sustancia blanca. Esta diferenciación ya había sido anteriormente sospechada por Ramón y Cajal y Achúcarro (ACHÚCARRO, 1911; RAMÓN Y CAJAL, 1913b).

En estos trabajos, Del Río-Hortega, (DEL RÍO HORTEGA, 1919c, 1920) demostró las variaciones morfológicas de la microglía en estado normal adaptándose a los intersticios tisulares, su

distribución más elevada en la sustancia gris y sus relaciones con otros elementos del sistema nervioso (neuronas, neuroglía y vasos sanguíneos). En el tejido nervioso normal, describió que las formas bipolares eran similares a las descritas por Alzheimer y Nissl (células de bastoncito) y, gracias al estudio del tejido nervioso patológico provocando encefalitis exudativas difusas, así como diversas y diferentes heridas en el cerebro de animales de experimentación, resolvió toda la cadena de la evolución natural de la microglía hasta su transformación final en los previamente descritos y denominados corpúsculos granuloadiposos (Merzbacher). Se admitió el carácter fagocitario de esta estirpe celular que aparece en los procesos destructivos del SNC, propiedad característica que no aparecía en las células que se encontraban “en reposo” o en condiciones normales, no patológicas.

Aunque Cajal y Del Río-Hortega coinciden en cuanto al origen mesodérmico de estas células, Cajal cuestiona las descripciones de Del Río-Hortega porque observó en la sustancia gris, además de la ya descrita microglía, otro elemento no nervioso que lo describe como una célula enana, globular, poliédrica, llamado “elemento enano perineuronal”, que es adendrítico. Por otra parte, también plantea dudas sobre la existencia de la glía interfascicular, descrita también por Del Río-Hortega (RAMÓN Y CAJAL, 1920).

En 1932, Del Río-Hortega presenta un capítulo del libro de citología de Penfield (DEL RÍO-HORTEGA, 1932) donde recopila todas las observaciones de la microglía hasta el momento y aporta como novedad un posible y distinto origen de esta estirpe celular, a partir de las leptomeninges durante los últimos momentos del periodo embrionario. El origen de la microglía ha sido un aspecto ampliamente estudiado y controvertido por numerosos autores. La discusión estriba entre el origen mesodérmico, al igual que el resto de las células sanguíneas y que es el más ampliamente aceptado, o el origen neuroectodérmico, como el de los astrocitos. Algunos autores asumen que la microglía proviene de monocitos circulantes que entran en el tejido nervioso atravesando el endotelio vascular, mientras que otros sugieren que la microglía proviene de macrófagos situados en las meninges y otros autores compatibilizan las dos opciones (BOYA, 1979, 1987a, 1987c; HICKEY, 1988; LING, 1982; MORI, 1969; SCHNITZER, 1989; THOMAS, 1992; TERUBAYASI, 1984; ZHANG, 1997). Después de numerosos trabajos, la controversia sobre origen, morfología, función u otros aspectos de esta estirpe celular (MARTÍN, 1989; THOMAS, 1992) aún se mantiene.

1.2.3.2.- Las técnicas de inmunomarcaje

Desde los estudios con plata de Del Río-Hortega hasta la actualidad, el estudio de la microglía se ha desarrollado de forma paralela a la identificación de marcadores específicos para esta estirpe celular, así como la puesta a punto de técnicas de inmunomarcaje que nos faciliten la observación exclusiva de estas células diferenciándolas de otros elementos gliales. Además, los avances tecnológicos de la microscopía electrónica nos aporta datos ultraestructurales importantes y, por último, las técnicas “in vitro” o de cultivos celulares nos permiten estudiar estas células en condiciones que podemos manipular y nos ayuda a la consecución de marcadores más eficaces y específicos.

El interés creciente en el estudio de las células microgliales durante la última década, ha producido un aumento en el estudio de nuevos marcadores específicos para esta población glial. Las estrategias seguidas han sido diferentes (ACARÍN, 1994):

- Por una parte, se encuentran los anticuerpos monoclonales: frente a OX-42 (CASTELLANO, 1990; DICK, 2001; THANOS, 1992; WU, 1998), frente a MUC 101 y 102, (GEHRMANN, 1991) anti MAC-1, anti-F4/80 y anti EMB-11, MHC (I y II) (BRODERICK, 2000; STREIT, 1989), OX-6 (HICKEY, 1988; LEHRMANN, 1997; ZHANG, 1997), Iba1 (IMAI 2002) entre otros. Su uso es restrictivo según especies y muchos de ellos han sido desarrollados contra epítomos de macrófagos, lo que hace que normalmente haya un marcaje más fuerte de la microglía ameboide y reactiva que en la microglía ramificada residente, que en ocasiones ni siquiera se marca. Un anticuerpo muy utilizado es frente a la vimentina, proteína de filamentos intermedios y que se expresa en la microglía activada o reactiva, resultando ausente en la forma ramificada. Pero este marcaje no resultaría específico, porque esta proteína está presente en otras células de origen mesodérmico. Otro marcador mucho menos utilizado es la inmunorreacción frente a la lipocortina 1 (LCR-1) utilizado por Zhang y McKanna en sus estudios de desarrollo de tejidos nerviosos (ZHANG, 1997). La LCR-1 obtiene un mayor porcentaje de marcaje de microglía que con lectinas o marcadores enzimáticos.
- Otra estrategia es el uso de la histoquímica enzimática para la demostración de la nucleósido difosfatasa (NDPasa) (HUMPHREY, 1996; SCHNITZER 1989, 1990), fosforilasa de nucleósidos de purina (PNPasa) (CASTELLANO, 1990) o pirofosfatasa de tiamina (PPTTasa) (SCHNITZER 1989; TERUBAYASHI, 1984), que han sido usadas para la visualización de células microgliales residentes in vitro y en diferentes especies. Es de destacar el trabajo de Castellano y col. (CASTELLANO, 1990) quienes mostraron con técnicas de doble marcaje en secciones de rata adulta dos estirpes celulares fácilmente distinguibles. Células PNPasa (-) que correspondían a las neuronas y células PNPasa (+) que eran de estirpe glial. En este grupo, se diferenciaban las PGFA (+) y OX-42 (-) correspondientes a las células astrogiales y las PNPasa (+) y OX-42 (+) que correspondían con las células microgliales. Sin embargo, el uso de estas técnicas está restringido a las secciones obtenidas por vibratomo debido a causas de sensibilidad enzimática, ya que se suelen obtener unos marcajes pobres cuando se usan cortes del criostato o en parafina.
- La histoquímica con lectinas nos revela otros marcadores microgliales fiables. Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos, lo que nos permite estudiar la composición química de las membranas e identificar tipos celulares específicos in vivo e in vitro. Estos estudios se basan en los hallazgos que muestran que las lectinas interactúan específicamente con grupos azucarados de membranas externas e internas de gran variedad de células, pero en el parénquima cerebral, parecen unirse específicamente a la microglía, no marcando ni los astrocitos ni los oligodendrocitos. Los glicoconjugados no son tan lábiles como las actividades enzimáticas, lo que permite que la histoquímica de lectinas se pueda

realizar incluso en secciones de parafina. En el sistema nervioso, las lectinas interaccionan con neuronas y otras estructuras, como los núdulos de mielina y otras membranas mielinizadas.

Se sabe que las estructuras carbohidratadas complejas son importantes en los procesos biológicos de reconocimiento celular, actividad receptora y adhesión celular. Diversos estudios han demostrado los siguientes residuos de azúcar sobre la membrana microglial, como la galactosa marcada por la aglutinina de semilla de soja, de cacahuete, de ricino "*Ricinus communis*", isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (STREIT, 1990) y lectina de muérdago, el ácido N-acetil neuramínico por la aglutinina de germén de trigo y la manosa por su unión a concavalina A. La lectina de tomate "*Lycopersicon esculentum*" en las células microgliales revela la presencia de poli-N-acetil lactosamina. Aunque no se conoce la función específica de este residuo azucarado en estas células, se sabe que los polilactosaminoglucanos en las membranas celulares juegan un importante papel en el reconocimiento celular.

La histoquímica de la lectina del tomate, aparece como un marcador microglial, permitiendo la visualización de la morfología completa de las células microgliales incluyendo los procesos microgliales más finos. También, con la isolectina B4 de la semilla de *Griffonia simplicifolia* (I-B4 GSA) se han obtenido buenos marcajes de la microglía ramificada. En este sentido, se sucedieron los trabajos dedicados a confirmar la utilidad de estos marcadores específicos para la estirpe microglial. Destacan el estudio de Streit y col (STREIT, 1987) sobre la reacción glial frente a la axotomía en el nervio facial de ratas, o durante el desarrollo embrionario de la retina de conejos (ASHWELL, 1989) y cerebro de rata (KAUR, 1991) donde se observaba la glía ameboide y ramificada.

Streit y col en 1987 (STREIT, 1987) estudian mediante técnicas inmunohistoquímicas la reacción glial a la axotomía en el nervio facial de ratas confirmando la proliferación de células gliales en respuesta a un daño y la especificidad de la unión de lectinas a la microglía por estudios citoquímicos. Para el marcaje de microglía utilizan concretamente el conjugado de I-B4 GSA y peroxidasa de rábano y anticuerpos contra PGFA para visualizar la astrogía. Streit confirma que la I-B4 GSA es específica para la unión de residuos alfa-D-galactosa en la población microglial, mientras que la aglutinina de cacahuete y *Ricinus communis* no mostraban reactividad. El doble marcaje (PGFA y lectina) de tejido nervioso dañado permitió discernir ambos tipos celulares con sus marcajes selectivos destacando que la respuesta de la microglía a la axotomía es muy rápida, con un pico durante la primera semana, mientras que la reacción astrocitaria parece aumentar gradualmente hasta alcanzar el máximo sobre la tercera o cuarta semana, donde las cantidades de ambas estirpes gliales se igualan.

En 1991 Boya y col. (BOYA, 1991a, 1991b) publicaron varios trabajos donde se comparan los marcajes obtenidos con IB4-GSA y aglutinina de *Ricinus communis* en distintas áreas del

encéfalo de ratas y conejos adultos, confirmando que estos marcadores son específicos para detectar la microglía.

Los estudios comparativos de sistema nervioso embrionario, postnatal y adulto resultan de gran interés con objeto de poder discernir entre los diferentes tipos de microglía implicadas y remodelado del tejido neuronal. Acarin en 1994 (ACARIN, 1994) muestra que la lectina de tomate en cerebros de rata postnatal y adulta, marca vasos sanguíneos y células gliales. En cuanto a las células gliales, el marcaje negativo frente a PGFA y positivo para la NDPasa indica que no son astrocitos sino posiblemente células microgliales, con algunos de sus procesos en íntima relación con astrocitos. La reactividad de la lectina se localizó en la membrana plasmática y citoplasma de la microglia ameboide y ramificada. En ningún caso, este autor observó que los núcleos estuvieran marcados. En cuanto al marcaje de los vasos sanguíneos, la unión de lectina de tomate fue encontrada en la membrana plasmática luminal y dentro del citoplasma de células endoteliales.

1.2.3.3.- Morfología general de la microglía del SNC

Como se ha señalado anteriormente, las descripciones que realizó Del Río-Hortega resultaron ser tan completas y detalladas, que desde la publicación de sus trabajos, no se aportaron datos adicionales relevantes hasta los estudios ultraestructurales por microscopía electrónica. Los trabajos de Del Río-Hortega sobre la microglía fueron confirmados por numerosos investigadores como Collado, Cajal, Gans, Metz y Spatz, Ley, Bailey y Hiller, Penfield, Creutzfeld, Alberca, Costero, Kushing, Timmer y L. Enríquez entre otros (LÓPEZ-ENRÍQUEZ, 1927; MARTÍN, 1989).

Del Río-Hortega, con su técnica del carbonato de plata, observa estas células abundantes en cortes de cerebro o cerebelo y las describe como corpúsculos de pequeño tamaño, con largas expansiones ramificadas que se extienden por la trama nerviosa y cuyo número y disposición varía dependiendo de la región estudiada. Estos conceptos generales, con los que están de acuerdo la mayoría de los autores, fueron discutidos por otros autores como Eager y col. en 1966 o King en 1968 (EAGER, 1966; KING, 1968) quienes presentaban dudas sobre su existencia, o por Maxwell y Kruger, Wendell-Smith y col, Watson (MAXWELL, 1965; WATSON, 1974; WENDELL-SMITH, 1966) quienes directamente negaron su existencia en tejidos no patológicos. Otros como Herndon, Bodian y Stensaas (HERNDON, 1964; MORI, 1969; STENSAAS, 1968) se limitaron a una ambigua descripción y en otros las ignoraron por completo, sin proceder a su mención, como Lesell y Kuwabara (LESSELL, 1963).

La descripción tanto a microscopía óptica como electrónica varía entre los autores, debido a la gran plasticidad de estas células, su capacidad de adaptación al entorno y la gran variedad de funciones que realizan. Por ello, todavía se dedican esfuerzos y estudios a su descripción morfológica. En general, los estudios coinciden en la presencia de unas características comunes en el núcleo, soma y prolongaciones.

El núcleo, a microscopía óptica, es de forma variable, normalmente redondo, ovalado o alargado, a veces parece un bastoncillo recto o se dobla de diversas formas. Su tamaño es el más pequeño de los observados en el tejido nervioso y en su interior muestra acumulaciones de cromatina, la acumulación de mayor tamaño representa el nucleolo. Ultraestructuralmente, el núcleo pequeño y denso, en sus formas alargadas mide aproximadamente 5 μ en su eje mayor. Su característica típica es que presenta cromatina en grumos y en contacto con la membrana nuclear. El nucleolo, único y grande es menos denso que los acúmulos anteriores, porque en él predomina el material fibrilar (BARÓN, 1972; BOYA, 1975; HERNDON, 1964; MORI, 1969, 1972).

El soma es muy pequeño y su forma depende de la del núcleo, y del número y extensión de las prolongaciones, por lo que su morfología es muy variada. Puede ser de silueta triangular, redondeada, fusiforme, oval, estrellada, etc... En el citoplasma, escaso en el cuerpo celular y algo más abundante en las prolongaciones, aparecen granulaciones diversas de naturaleza lipóide, pigmentaria, etc..., cuya distribución difiere según la forma del núcleo. La estructura aparece más laxa con tinción más débil en la zona perinuclear y más densa en los bordes y en las expansiones protoplásmicas.

La descripción mediante microscopía electrónica del citoplasma, retículo endoplásmico, ribosomas, centriolos y microtúbulos, difiere según los autores (BOYA, 1975; GALLEG0, 1986; MORI, 1969; MURABE, 1982a; STREIT, 1987). La mayoría coinciden en la presencia de liposomas y cuerpos osmiófilos (densos) tanto en el citoplasma perinuclear como en las prolongaciones.

Por último, las prolongaciones, varían en número, longitud y grosor, pero todas parten del soma ensanchadas y se adelgazan a media que se alejan del mismo. Se van ramificando en expansiones secundarias y terciarias como finísimos hilos que se encuentran cubiertas de espinitas laterales, que emergen en ángulo recto y corren tortuosas para terminar directamente, o previa dicotomización, entre las estructuras nerviosas, según Gallego (GALLEG0, 1986) con terminales burdos y engrosados.

Esta morfología general varía debido a la facultad que tienen estas células de adaptarse a los intersticios del tejido nervioso circundante. La más común denominada "microglía ramificada", correspondiente a las células microgliales que se encuentran en reposo en el tejido nervioso, es la forma multipolar, pero hay mucha diversidad de formas de adaptación. A veces, se observan formas unipolares con una sola prolongación altamente ramificada, que suelen ser el resultado de la división de una célula bipolar. Algunas células microgliales adoptan una morfología aplanada provocada por su adaptación al espacio entre los paquetes de fibras nerviosas o alrededor de vasos sanguíneos, denominándose en este caso, lamelares.

Todos los órganos del encéfalo contienen microglía, siendo más abundante en la sustancia gris que en la blanca. Se relacionan con las células nerviosas, a veces envolviéndolas, y con los

vasos, acompañándolos durante trayectos más o menos largos, pero sin insertarse en ellos. En raras ocasiones, tienen relación directa con otras neuróglías.

La morfología de la célula microglial no sólo varía dependiendo del espacio circundante, sino también dependiendo de la función que esté realizando (THOMAS, 1992). Así, además de la morfología general de la microglía ramificada, se pueden identificar una microglía ameboide presente en el desarrollo del tejido cerebral (prenatal tardío y postnatal temprano) con aspecto amplio y aplanado con pseudópodos, algo parecido a los macrófagos y, una microglía reactiva, presente en gran cantidad en el tejido adulto, tras lesión o afectación, estando caracterizada por una morfología oval o en forma de bastón carente por completo de procesos ramificados.

La glía ameboide y reactiva pueden exhibir características de macrófagos activos, mientras que la glía ramificada parece tener reducidas significativamente sus funciones de macrófago (GEHRMANN, 1991; PERRY, 1988). De hecho, aunque sería excesivo afirmar que la microglía son macrófagos, lo que es cierto es que hay evidencias de que, en opinión de algunos autores, la microglía presenta muchos componentes y actividades de los macrófagos, por lo que la microglía podría constituir un tejido de macrófagos residentes en el SNC (PERRY, 1988; RAIVICH, 1999; THOMAS, 1992). Por tanto, se piensa que la microglía ameboide, ramificada y reactiva son formas diferentes de un tipo celular único, de forma que la microglía ameboide se convierte en macrófagos activos durante el desarrollo y en los precursores de microglía ramificada inactiva que puede reactivarse en el tejido adulto, por alteración del mismo, convirtiéndose en microglía reactiva.

Esta suposición ha sido demostrada por estudios de microglía en cultivos celulares donde se ha observado la transformación de microglía ramificada en ameboide y reactiva, exhibiendo éstas últimas un aumento en la expresión de propiedades macrofagocíticas en respuesta a varias citoquinas, factores de astrocitos o que afectan a la función de macrófagos (SUZAMURA, 1991). En conclusión, las células microgliales están caracterizadas por un alto grado de plasticidad morfológica y funcional, y los diferentes estados morfológicos se correlacionan con las diferentes funciones que realizan.

1.2.3.4.- Funciones de la microglía

1.2.3.4.1.- Fagocítica y reparadora frente al daño neuronal.

La microglía es la tercera población de células gliales en el SNC, después de los astrocitos y los oligodendrocitos. Las células microgliales se muestran bastante sensibles a cualquier mínima alteración de la homeostasis del Sistema Nervioso, activándose rápidamente durante la mayoría de las patologías neuronales. Durante su activación, la microglía desarrolla una importante plasticidad funcional que implica cambios en su número, en su morfología celular, en la expresión de sus receptores de superficie y en la producción de factores de crecimiento y citoquinas (STREIT, 2000).

En relación con los cambios en la morfología celular, fue del Río-Hortega quien estudiando la microglía en tejido normal y patológico observó las características de célula en reposo que mostraba la microglía en situación normal, ya señaladas anteriormente y que éstas variaban ante un daño neuronal, presentando una función migratoria hacia la zona dañada donde mostraban una capacidad fagocítica.

En los procesos patológicos de varias partes del encéfalo, Del Río-Hortega (DEL RÍO-HORTEGA, 1932) describió la transformación morfológica que sufría la microglía convirtiéndose en células en bastoncito y cuerpos granuloaliposos que desarrollaban una actividad fagocitaria de los productos de desecho nervioso. Los primeros cambios se observan en las ramificaciones, las cuales aumentan de volumen, y por tanto, sus finas prolongaciones, se transforman en gruesos procesos. Posteriormente, aumenta también el volumen del cuerpo celular, que adquiere una estructura reticulada y un aspecto abultado. Debido a la retracción de los procesos celulares, disminuyendo en número, se observan más formas bipolares que multipolares. Estas formas bipolares aumentan su capacidad de migración hacia los focos de destrucción. Así, finaliza la transformación en células en bastoncito, descritas por Nissl y Alzheimer. Estas células se suelen orientar paralelamente a los vasos sanguíneos, perpendiculares a la superficie cortical. En su citoplasma, se observan gotas lipídicas y vacuolas pequeñas, posiblemente con productos de desintegración. Con el reactivo de Perl para el hierro, este tipo celular muestra una intensa tinción, lo que refleja fagocitosis de hematíes en zonas hemorrágicas. Si continúa el proceso de transformación, con más acumulación de productos de desecho y retracción de las prolongaciones, estas células adquieren una forma más redondeada, con un citoplasma reticulado y vacuolado, resultando en corpúsculos granuloaliposos. De esta forma, estas células se acercan a zonas vascularizadas donde degeneran y liberan su contenido que se hace soluble alcanzando los vasos sanguíneos por difusión (VRABEC, 1975; WOLTER, 1960).

Estas observaciones, según Del Río-Hortega, respondían a la supuesta controversia en cuanto al origen de estas formas descritas, ya que, en su opinión, todas estas formas provienen de la misma estirpe celular microglial. Sin embargo, el mismo autor admite que si los daños vasculares son intensos, se pueden extravasar leucocitos y células endoteliales que pueden transformarse en corpúsculos granuloaliposos (DEL RÍO-HORTEGA, 1919b). En el mismo sentido, Boya opina que hay dos fuentes de origen para los fagocitos que aparecen en el tejido nervioso después de una lesión: fagocitos endógenos de origen microglial y fagocitos exógenos de origen hematógeno (BOYA, 1986, 1987b; CARBONELL, 1991; STREIT, 1989).

En preparaciones histológicas, Streit y col. (STREIT, 2000) describe los focos necróticos reconocibles por el acúmulo de 6 o más células microgliales fagocíticas. Para estructuras grandes, se forman nódulos de entre 3 y 20 células microgliales fagocíticas (RAIVICH, 1999). Esta acumulación microglial, junto con otros cambios como la formación de células en bastón y la fusión celular,

ocurren frecuentemente durante el envejecimiento, confirmando el incremento de la activación microglial que ocurre con la edad.

Aunque la función fagocítica de la microglía descrita hace más de 80 años, ya no es discutible; existen otros aspectos en controversia; como la conversión de la microglía en macrófagos o el origen de éstos (THOMAS, 1992). La microglía parece ser capaz de convertirse en macrófagos activos (microglía reactiva), mientras que ni se parecen ni actúan como macrófagos en el tejido normal (microglía ramificada o microglía denominada “residente”) (STREIT, 1989). Numerosos trabajos investigan la posible activación de la microglía y su conversión en macrófagos. Además de las modificaciones morfológicas y la proliferación de la microglía observables frente a la lesión provocada en el tejido nervioso (THOMAS, 1992; STREIT, 1987), se ha detectado la presencia de moléculas receptores de inmunoglobulinas, moléculas características de macrófagos y complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de Clase I y II, (BRODERICK, 2000; CUFF, 1996; DICK, 2001; GEHRMANN, 1991; HICKEY, 1988; STREIT, 1989; ZHANG, 1997) pudiéndose utilizar algunas de ellas como marcadores. Por tanto, las células microgliales parecen presentar características y actividades de macrófagos, señalando a la microglía como células inmunes del SNC, aunque con una limitada participación inmunitaria.

La existencia de actividad fagocítica por parte de la microglía reactiva, parece ser que está relacionada con la ausencia o presencia de muerte celular. Así pues, según los trabajos de distintos grupos (ACARIN, 1998; STREIT, 1989), cuando la microglía es activada por daño neuronal y regeneración, se producía una hipertrofia y un aumento de la expresión de rasgos de macrófagos, (características inmunes y proliferación por mitosis) sin presentar función fagocítica, mientras que cuando hay muerte neuronal y degeneración, la función fagocítica se activa procediendo a la limpieza de los restos celulares de las neuronas muertas. Así, se define una forma intermedia entre la microglía y su conversión a macrófagos, denominada “microglía activada”. Ésta forma celular muestra un cuerpo celular hinchado y procesos más gruesos que las células ramificadas, coincidiendo con la descripción de la microglía reactiva de Del Río-Hortega. Por tanto, hay al menos cuatro formas celulares de microglía incluyendo las células ameboides fetales, de forma que el proceso de activación o conversión implica una transición desde células microgliales ramificadas a formas activadas y por último células fagocíticas reactivas.

Los diversos estudios realizados en relación con la activación microglial, (THOMAS, 1992) mostraron que, todos los tipos de alteraciones tisulares que implican daño neuronal, aparentemente producen una activación microglial, aunque también pueden estar presentes macrófagos procedentes de monocitos sanguíneos, cuando la vascularización y la BHE han sido afectadas. El peso de la contribución de ambos tipos es un tema en discusión, siendo para algunos autores la contribución de la microglía residente más importante que la procedente de los vasos sanguíneos (ACARIN, 1998; CARBONELL, 1991; FAWCETT, 1999; PERRY, 1988; STREIT, 1989).

Esta activación microglial está mediada por una serie de agentes específicos y requiere una comunicación directa desde las neuronas. La promoción o regulación de la activación nos daría la clave de la función microglial y la inmunología del SNC. La microglía puede recibir señales de activación por diversos factores (como interleuquinas, factores estimuladores de colonias, lipopolisacáridos y gamma-interferón conocidos como activadores de macrófagos), como parte de la comunicación con astrocitos, neuronas, endotelio e infiltrados de leucocitos. Además, la microglía activada tiene capacidad para liberar citoquinas, como intermediarios inmuno y neuromoduladores (SUZAMURA, 1991) (HUMPHREY, 1996). Aunque está demostrado que, en principio, el papel de la actividad microglial tiene como objetivo la protección del SNC, también se conoce y se discute su implicación neurotóxica. Este debate se crea por el hecho de que estudios “in vitro” muestran tanto efectos neuroprotectores como neurotóxicos sobre neuronas cultivadas, mientras que los estudios “in vivo” apoyan el papel neuroprotector y pro-regenerativo de esta estirpe. La clave se encuentra en determinar qué ambiente desencadena cada una de estas funciones. En opinión de Streit (STREIT, 2000), el factor que determina el papel neuroprotector o neurotóxico de la microglía es el tipo de señal que emita la neurona afectada. Si la neurona ha sido afectada levemente y puede ser regenerada, la señal neuronal emitida estimulará a la microglía activada para ayudar a la neurona a su regeneración. Si, por el contrario, el daño es lo suficientemente intenso como para ser irreversible, el tipo de señal emitida por la neurona que degenera hacia la microglía, consistirá en activar sus características neurotóxicas con el fin de ayudar a provocar la muerte celular programada o apoptosis. Así, en lesiones agudas, como trauma o isquemias, una neurotoxicidad indiscriminada, perjudicaría el proceso de recuperación tisular, por ello parece que ocurre una neurotoxicidad facilitativa (“eutanasia celular”) que se refiere a la eliminación de neuronas por parte de la microglía activada fagocítica. Sin embargo, si esa activación es excesiva o mantenida, se provoca una mala regulación de liberación de citoquinas, lo que potencia la faceta neurotóxica pudiendo contribuir al desarrollo y evolución de patologías crónicas y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson u otras demencias (STREIT 2002, HANISCH 2002).

La temprana activación microglial después del daño y la consiguiente secreción de citoquinas juega un papel primordial para desencadenar la respuesta astrogial. Ambas estirpes reaccionan al daño de una forma sincronizada y se sabe que tanto la microglía como los astrocitos pueden producir y también responder a muchas citoquinas como interleuquinas, interferones, factor de necrosis tumoral, de crecimiento tumoral, estimuladores de colonias como quemoquinas; de los que aún está por determinar si pueden resultar favorables o desfavorables para la regeneración del tejido nervioso (ACARIN, 1998; GREGERSEN, 2000; ZHAO, 1998). Esto indica una interacción recíproca entre la microglía y los astrocitos en los procesos de cicatrización después de una lesión del tejido nervioso. Los astrocitos apoyan la función fagocitaria de la microglía activada y los productos solubles secretados por ésta son requeridos para la evolución de la respuesta astrocitaria (HANISCH 2002). Parece ser que el mecanismo es el siguiente: factores liberados en el daño tisular producirían astrocitos reactivos quienes, a su vez, secretarían una sustancia mitogénica ante la cual la microglía ramificada proliferaría y se transformaría en reactiva. Una determinada cantidad de microglía

activada, cuando acabara de limpiar los desechos celulares, conseguiría una concentración suficiente de sustancias mitogénicas, que desencadenaría la proliferación astrocitaria resultando en la formación de la cicatriz (ACARIN, 1998; GIULIAN, 1985; THOMAS 1992; WU, 1998).

En opinión de Streit (STREIT, 1989) es la degeneración de las motoneuronas, la que induce a las células microgliales a convertirse en mitóticamente activas, seguido unos días después por un aumento en el número de astrocitos hipertrofiados fuertemente PGFA (+), mientras que no observa la división de astrocitos.

La retirada de desechos y el reestablecimiento de la normal vascularización, es un aspecto crucial en la inflamación y reparación en otros tejidos, por lo que es de esperar que los macrófagos jueguen un papel similar en el sistema nervioso (PERRY, 1988). Carbonell en 1991 (CARBONELL, 1991), estudió la degeneración del NO de ratas al MET destacando la presencia de macrófagos de probable origen microglial que limpiaban la mielina degenerada, los astrocitos sufrían una proliferación e hipertrofia, cargándose de gliofilamentos formando la cicatriz glial, mientras que los oligodendrocitos permanecían quiescentes.

Estos estudios han demostrado la comunicación de la microglía con los astrocitos y también con las neuronas, pero el papel de la microglía en la regeneración neuronal también ha sido puesto de manifiesto por la comunicación entre la microglía y los oligodendrocitos. Así, una señal proveniente de macrófagos parece resultar necesaria para la proliferación de las células de Schwann (PERRY, 1988) o según señala otro estudio, astrocitos y microglía secretarían interleukina-6 (THOMAS, 1992) que podría estimular la producción de factor de crecimiento nervioso para la regeneración neuronal. La relación de la microglía con los oligodendrocitos ha sido ampliamente estudiada por Vela y col. (VELA 1995, 1996) quienes utilizando un modelo murino mutado que provoca una importante hipomielinización, mostraron que las células microgliales y no los astrocitos están íntimamente relacionados con los oligodendrocitos que degeneran, estando implicadas fundamentalmente en la limpieza de desechos provenientes de la muerte celular.

1.2.3.4.2.- Moldeadora en la histogénesis durante el desarrollo

Como se ha tratado anteriormente, la microglía ramificada normal puede convertirse en macrófagos en situaciones especiales (patología, daño neuronal), pero además parece ser que esta microglía ramificada del tejido adulto parece derivarse de células ameboides con capacidad fagocítica que aparecen durante el desarrollo. A medida que se avanza en el desarrollo, se pierde la capacidad fagocítica y se adquiere una morfología más ramificada, posiblemente asociada a la disminución de los espacios extracelulares entre las células nerviosas (BOYA, 1987a, 1987c; SCHNITZER, 1989; ZHANG, 1997).

La mayoría de los estudios realizados en retina con distintas técnicas (ASHWELL, 1989; BOYA, 1987a; HUME, 1983) muestran a la microglía participando en la retirada de los restos celulares durante el desarrollo, principalmente postnatalmente, contribuyendo por tanto a la histogénesis (LING, 1982; MURABE, 1981a). Muchos autores (ASHWELL, 1989; BOYA 1981, 1987a; HUME, 1983; LING, 1982; PERRY, 1988; TERUBAYASHI, 1984; SCHNITZER, 1989; VRABEC, 1970) sugieren que el estímulo para la invasión de la retina es la presencia de desechos celulares generados por la muerte de células nerviosas durante los primeros días post-natales. Aunque parece claro que participan otros mitógenos microgliales, la muerte celular podría al menos promover la activación de las células ameboides, así como su proliferación para alcanzar el nivel de población en el tejido adulto. Hume incluso sugiere que la microglía puede secretar sustancias que activen la extensión de neuritas y por tanto la formación de las plexiformes.

Debido a la ausencia de meninges en la retina, Boya sugiere que la fuente de células gliales son los vasos sanguíneos, ya que en la retina la penetración de éstos y los precursores microgliales ocurren simultáneamente (BOYA, 1979, 1987a, 1987c; TERUBAYASHI, 1984). Sin embargo, Schnitzer pone en duda este aspecto en el caso concreto del conejo, ya que la retina permanece avascular hasta 1 semana post-natal y la presencia de microglía es anterior, por lo que lo relaciona con la aparición de la muerte celular y no con la vascularización (SCHNITZER, 1989). Ashwell (ASHWELL, 1989) observó que la glía ameboide aparece 11 días antes de la muerte de axones en el NO del conejo y 14 días antes del comienzo de la muerte neuronal de las células ganglionares. En su opinión, estos hallazgos indican que, mientras los precursores microgliales pueden entrar en la retina en respuesta a los desechos generados durante el periodo de muerte de células ganglionares, la mayoría entran antes de este momento. Algunos trabajos continúan insistiendo en el origen neuroepitelial de la microglía ramificada, más que mesodérmico coincidiendo con el de los macrófagos (ZHANG, 1997).

Como ocurría en el tejido nervioso adulto dañado, la microglía ameboide estimula la mitosis astrocitaria, apoyando la idea de su implicación en la gliogénesis (PERRY, 1988; SCHNITZER, 1989; THOMAS, 1992). Por otra parte, las células ameboides pueden influir en el crecimiento neuronal segregando factor de crecimiento nervioso (HUME, 1983) o en la angiogénesis con el factor de crecimiento tumoral (PERRY, 1988). Incluso podría estar implicada directamente en la muerte neuronal mediante la liberación de las neurotoxinas (FRADE, 1998).

Estos estudios, por tanto, apoyan la idea de que las células microgliales ameboides contribuyen durante el desarrollo a crear la citoarquitectura tisular e histogénesis, al menos mediante la retirada de restos relacionados con la muerte celular y la estimulación de la gliogénesis astrocitaria.

1.2.3.4.3.- Reguladora de fluidos

Según Thomas (THOMAS, 1992), la microglía ramificada o “residente” de los tejidos adultos normales y que es considerada inactiva o sin contribución funcional directa, tiene la función de regular los líquidos constitutivos del tejido. Esta posible función, se basa fundamentalmente en dos observaciones previas en cultivos celulares. Por una parte, las células ramificadas, carentes de la capacidad fagocítica, muestran una alta actividad de endocitosis, concretamente pinocitosis y por otra parte, se ha observado que estas células presentan una alta motilidad y rápidos cambios de forma mediante la retracción y extensión de sus procesos (BOOTH 1991; THOMAS, 1992).

La combinación de ambas características sugiere una actividad a modo de esponja facilitando la absorción. Si se considera la distribución regular y uniforme de la microglía ramificada con altos niveles de enzimas degradativas, se puede pensar en un sistema de absorción y posterior destrucción de los componentes pinocitados. Thomas y col. (THOMAS, 1992) sugieren una función limpiadora del fluido extracelular en el tejido cerebral normal, además de utilizar esta característica pinocítica como marcador específico de estas células.

1.2.3.4.4.- Otras funciones

Otros autores han señalado diversas funciones diferentes de las señaladas anteriormente (MARTÍN 1989):

- Papel en el metabolismo neuronal en la vía metabólica de la tiamina (MURABE, 1982b).
- Posible implicación en determinadas sinapsis axodendríticas de la corteza cerebral, presumiblemente colinérgicas (MURABE, 1981a, 1981b, 1982a).
- Posible implicación en actividades del espacio extracelular, donde tiene lugar el intercambio de iones entre los vasos sanguíneos y las neuronas.
- Interdependencia funcional entre microglía, neuronas y vasos sanguíneos. Las células microgliales aumentan en número durante los periodos en que se aumenta la síntesis de proteína en las neuronas (KREUTZBERG, 1968).
- Podría intervenir en la dinámica del líquido cefalorraquídeo (CAMMERMEYER, 1970).

1.2.3.5.- La morfología y distribución de la microglía de la retina

Marchesani en 1926 (MARCHESANI, 1926) en su estudio sobre los elementos neurogliales de la retina confirmó con respecto a la microglía que se teñía de forma incompleta y se situaba en la CNI, CPI y CCG presentando propiedades ameboides y fagocíticas. Simultáneamente, López Enríquez, discípulo de Del Río-Hortega, en 1926 y 1927 (LÓPEZ ENRÍQUEZ, 1926, 1927) estudia la microglía normal y patológica en la retina, nervio óptico, quiasma y cintillas ópticas del hombre, mono, conejo y cerdo, utilizando el método de carbonato de plata amoniacal. Sus observaciones microscópicas de la microglía retiniana coinciden con las expuestas por Del Río-Hortega para el

cerebro y cerebelo, e insiste en que esta morfología típica microglial es inconfundible con la del resto de elementos neuróglícos de la retina. Señala, que el núcleo de estas células había sido observado por otros autores anteriormente pero no sus prolongaciones que pasaron inadvertidas o fueron descritas como propias de neuroglia.

Según este autor, la microglía se puede observar en la retina en la CFNO, CCG, CPI y presumiblemente en la CNI. En su opinión, estas células pueden alcanzar hasta la CPE con la presencia de capilares. Su distribución no es caprichosa o al azar, ya que están regularmente distanciadas, equidistantes entre sí, y las expansiones microgliales se adecuan al espacio que las rodea. Así, a nivel de la CPI la distribución es más flexuosa y amplia, mientras que en la capa de las fibras ópticas, es más recogida y menos ondulosa, distribución confirmada también por Humphrey 1996 (HUMPHREY, 1996). En las vías ópticas la microglía es abundante, pero menos que la oligodendroglía. Su morfología general es la descrita anteriormente pero, en su adaptación al medio, predominan las formas bipolares y los núcleos alargados, en bastón, ovalados, fusiformes, en pera, etc... Se encuentra distribuida en toda la extensión del NO y se relaciona fundamentalmente con las fibras nerviosas a las que acompaña en su trayecto, junto con las células neuróglícas y los septos conjuntivos.

En 1937, Balado y Franke hicieron una breve descripción de la microglía del cuerpo geniculado lateral en su monografía sobre este centro visual y Polýak, en 1941, describió la microglía únicamente en la CPI (MARTÍN, 1989). En 1963, Lessel y Kuwabara (LESSEL, 1963), describiendo la neuroglía retiniana, ni siquiera mencionaron la existencia de la microglía. Vrabec entre 1968 y 1970 (VRABEC, 1968, 1970) describe detalladamente la microglía en la retina, vías ópticas, cuerpo geniculado lateral, área estriada y techo óptico del mono y conejo utilizando distintas tinciones argénticas. En la retina, sitúa los elementos microgliales entre el MLI y la CPE. Destaca la observación de núcleos microgliales en la CCG y CNI, situados en las zonas más próximas a las plexiformes donde envían sus prolongaciones e incluso se observan núcleos en la misma CPI. La observación de la microglía en la CFNO y CCG es más difícil porque adoptan una morfología alargada. En la CPE, la morfología difiere de la adoptada en el resto de capas. Los núcleos se localizan en la zona más interna de la CPE, su cuerpo celular es redondo, ovalado o triangular, de forma que el eje mayor queda paralelo a la superficie externa de la retina. Emiten dos o más prolongaciones largas, onduladas en su recorrido horizontal, que tienen más ramificaciones, cortas y espinosas perpendiculares a las principales. Estas últimas alcanzan los fotorreceptores, células bipolares y células horizontales donde finalizan a este nivel con pequeños bulbos terminales. Se encuentran células similares entre los cuerpos celulares de los fotorreceptores, pero en este caso las terminaciones espinosas terminan en la línea de sinapsis. Coincidiendo con Vrabec, Boycott y Hopkins en 1981 (TERUBAYASHI, 1984), detectaron también células microgliales en la CPE, mientras que Ling en 1982 (LING, 1982) las sitúa mayoritariamente en la CPI y no en CPE.

Los estudios con las técnicas de tinción de plata tienen sus limitaciones y, aunque la descripción morfológica es compartida por la mayoría de los autores, la distribución en las capas

varía. Con la aplicación de los estudios inmunohistoquímicos y la microscopía electrónica, el estudio de esta estirpe glial, de su morfología, distribución y transiciones ha generado numerosos trabajos.

Murabe y Sano en 1981 (MURABE 1981a) utilizaron la tiamina pirofosfatasa (TPPasa) como marcador de células microgliales en el SNC. Observaron actividad TPPasa en la membrana plasmática de células microgliales, pero no en otros elementos gliales. Esta técnica fue aprovechada por Terubayashi en 1984 (TERUBAYASHI, 1984) para estudiar las retinas de rata y analizar la morfología y localización exacta de las células gliales TPPasa-positivas, con microscopía óptica y electrónica. La morfología microglial que observó era la característica y ya descrita para estas células. En montajes planos, observó una intensa reacción TPPasa en células distribuidas en toda la retina y en la pared vascular de capilares; en cortes transversales, observó células gliales TPPasa-positivas en diferentes niveles de la CPI y CCG. Ultraestructuralmente, el producto de la reacción TPPasa se manifestaba sobre la superficie de la membrana plasmática de las células microgliales y pericitos, membrana basal de células endoteliales y orgánulos intracelulares de las células ganglionares.

También con métodos inmunoenzimáticos, pero en este caso la NDPasa, Schnitzer (SCHNITZER, 1989) describe que en el periodo postnatal temprano, la microglía aparece en la CFNO, CPI y CPE; mientras que en adulto no la observa en la CPE. En el adulto, las células de la CPI son de morfología estrellada como la descrita por Del Río-Hortega (DEL RÍO-HORTEGA, 1932) disponiéndose en dos estratos: procesos cercanos al borde CCG/CPI o procesos cercanos al borde con la CNI. La microglía de la CFNO no tiene morfología estrellada sino que se alinea con los axones, observándose una mayor densidad en las zonas de los radios medulares. Las diferencias morfológicas y en la distribución vienen dictadas por el espacio que pueden ocupar y la función que deben realizar. En contra de Schnitzer que no detecta actividad NDPasa(+) en la CPE en la retina adulta, Humphrey y Moore (HUMPHREY, 1996) en montajes planos de retinas de conejos sitúan la microglía en la CPE donde presenta procesos mucho más ramificados ocupando zonas más amplias que la situada en la CPI. Procesos provenientes de la CPI se dirigen a la CNI y CPE donde generalmente acaban engrosados excepto en algunos casos que forma pequeñas ramitas.

Ashwell en 1989 (ASHWELL, 1989) estudió la microglía durante el desarrollo de la retina del conejo albino ayudándose del marcaje proporcionado por la lectina de Griffonia simplicifolia. En la retina madura sitúa la microglía en la CPI y CCG, coincidiendo fundamentalmente con Schintzer. Es de señalar que describe unas células en la superficie vítrea con apariencia de microglía pero sin sus características prolongaciones.

En 1994, Bopp y col. (BOPP, 1994) estudiaron la localización y distribución de los residuos carbohidratados en retinas humanas normales y patológicas usando técnicas histoquímicas de diferentes lectinas. En las retinas normales, la Con-A, WGA, RCA I, PNA se unían a los fotorreceptores y células del EPR, concretamente en los segmentos externos distales y en la porción apical de las células epiteliales. La coincidencia en al menos cuatro tipos de lectinas indica que los

residuos carbohidratos son idénticos en ambas localizaciones. Hay que señalar que la aglutinina de cacahuete (PNA) se une específicamente a los conos, mientras que la aglutinina de germen de trigo (WGA) tiene preferencia por los bastones. Se han detectado sitios de unión a estas aglutininas no sólo en los fotorreceptores sino también en la matriz interfotorreceptora, sugiriendo que esta matriz pueda ser importante para el reconocimiento de los discos de los segmentos externos durante la fagocitosis, transporte de sustancias nutritivas, metabolitos de la vitamina A, adhesión retiniana y contribuyendo a mantener la integridad anatómica y funcional del complejo fotorreceptor-EPR. Es decir, en retinas normales, la localización de la distribución de los sitios de unión de lectinas en los fotorreceptores y EPR es característica que demuestra su integridad estructural y funcional. Por tanto, los cambios en los patrones de marcaje con distintas lectinas, no sólo diferencian la matriz intercelular de los conos de la de los bastones, sino también las retinas sanas de las patológicas. (BOPP, 1994; JOHNSON, 1987; SAMESHIMA, 1987; YAO 1990).

1.2.4.- IMPLICACIÓN DE LA GLÍA EN TEJIDOS VISUALES PATOLÓGICOS

En las secciones referentes a las funciones de las distintas estirpes gliales se ha discutido su relación con algunas lesiones o alteraciones del tejido nervioso. El tejido retiniano forma parte del Sistema Nervioso, pero posee características propias y la respuesta de la macroglía y microglía frente a daños o alteraciones sufridas por el tejido retiniano tiene algunas particularidades.

1.2.4.1.- Respuesta macroglial

1.2.4.1.1.- Cambios en la inmunorreactividad de la macroglía

La implicación de las distintas estirpes macrogliales en la etiopatogenia de algunos procesos patológicos o de respuesta frente al daño neuronal queda señalada por los cambios que se observan en la expresión de determinados marcadores en los tejidos alterados en comparación con los tejidos sanos o no dañados (GEHRMANN, 1991).

Al igual que ocurría en otras zonas del SNC, la PGFA es un marcador específico fundamentalmente de la astrogliá retiniana, mientras que la glía de Müller suele presentar una inmunorreactividad negativa frente a dicha PGFA en condiciones normales (SCHNITZER 1985,1986). Sin embargo, el cambio de esta inmunorreactividad en la glía de Müller es patente cuando el tejido retiniano sufre algún tipo de alteración o lesión, siendo destacado por los trabajos de varios en tejido nervioso no asociado a estructuras visuales (STREIT, 1987) y su significado aún está en estudio.

En los tejidos nerviosos asociados a las estructuras visuales, Bignami en 1979 (BIGNAMI, 1979) observó que la glía de Müller aparecía PGFA(+) cuando se producía una lesión en el NO.

Björklund y col en 1985 (BJÖRKLUND, 1985a, 1985b) describieron que en la retina de ratas, la glía de Müller se muestra positiva a los cuatro días después de haber seccionado el NO. Scherer en 1991 (SCHERER, 1991) obtuvo un resultado similar en las retinas de conejos y Thanos y col. (THANOS, 1992) en 1992 en ratas. En el trabajo de Scherer, se destaca que las células de Müller comienzan a expresar PGFA de forma transitoria, cuando la degeneración de las células ganglionares se hace detectable; sin embargo no se observó un aumento en la intensidad del marcaje con vimentina en las células de Müller, ni de la PGFA en los astrocitos. Similares resultados fueron obtenidos por otros autores, (Newman E.A, 2001a).

Humphrey y col. en 1993 (HUMPHREY, 1993), aprovecharon la estructura bidimensional de la retina para estudiar la reacción de respuesta frente al daño neuronal en el tejido nervioso. Para ello, estudiaron el marcaje en el tiempo y en el espacio que ocurría en la glía de Müller, después de producir lesiones de fotocoagulación por láser de argón azul-verde/verde en montajes planos de retina de conejos. A las 24 horas de la fotocoagulación observaron inmunorreactividad PGFA (+) 2-3 mm alrededor del lugar de la lesión, que disminuía en intensidad hacia los márgenes. Esta reacción de la glía de Müller fue máxima a las 2-3 semanas, alcanzando los 4-5 mm, y comenzó a disminuir a partir del mes, quedando únicamente una zona central inmunopositiva alrededor de la lesión visible a los 2 meses post-fotocoagulación. El área de disrupción del EPR y de alteración de la retina neural era mayor que la zona concreta de impacto donde se produce la absorción de energía, pero siempre inferior a la de reacción de la glía de Müller en los estadios de tiempo hasta 43 días. Describieron una reacción de la totalidad de la retina cuando se realizaban múltiples lesiones o simplemente con una fila de 5 a 10 lesiones por impacto del haz láser. Esta dispersión de la reacción glial podía ser desencadenada por la difusión de sustancias desde la lesión o por la existencia de una comunicación celular directa. Este efecto indirecto tan extenso sobre las células de Müller, podría ser un importante componente del efecto clínico de la fotocoagulación por láser e indicaría mecanismos de comunicación a larga distancia entre las células gliales de la retina. Años después (HUMPHREY 1997), realizó un estudio similar en ratas, confirmando que la expresión de la PGFA en la glía de Müller aparece a las 24 horas, aumentando en intensidad a los 2 y 3 días postfotocoagulación. Es de destacar que el marcaje se limita a los bordes periféricos de la lesión, quedando exento el centro, en opinión del autor debido a que en esta zona central, las células están destruidas o tan intensamente dañadas impidiendo la expresión de esta proteína. El marcaje PGFA + de las células de Müller se mantiene visible e intenso para la mayoría de las células después de 1, 2 y 3 semanas postofotocoagulación. Posteriormente, el inmunomarcaje pierde intensidad, siendo débil a los 30 días y apareciendo en sólo unas pocas células a los 45 días. En este estudio también se destaca la aparición de una cicatriz astrogliar PGFA + en el centro de la lesión, con procesos que llegan hasta la corioidea.

La relación de algunas patologías retinianas con este incremento en la expresión de PGFA por parte de la glía de Müller ha sido referida por algunos estudios. Barber en el año 2000 (BARBER, 2000) en sus trabajos con ratas diabéticas, destacó que se producía una disminución en el marcaje frente a PGFA en los astrocitos, mientras que aumentaba la inmunorreactividad frente a este

anticuerpo en la glía de Müller. En el año 2001, Ramírez y col. (RAMÍREZ, 2001) observaron aumento de la inmunorreactividad frente a la PGFA de los astrocitos y la glía de Müller reactiva frente a esta proteína, en retinas humanas de personas ancianas con degeneración macular asociada a la edad.

Al igual que ocurre con la PGFA en la glía de Müller, el anticuerpo frente a la proteína S-100 no se detecta en retinas en condiciones normales, pero aparece un inmunomarcaje positivo en retinas en condiciones patológicas. Además de la PGFA, la proteína S-100 fue utilizada por Terenghi y col. en 1983 (TERENGHI, 1983) para marcar las células de Müller en retinas patológicas de ratas, cobayas y hamsters, que aparecían S-100 (+), destacando una proliferación glial que reflejaba los daños neuronales que estaban ocurriendo. Resultados similares fueron obtenidos por BenErza y Chang en 1987 (BenEZRA, 1987) que únicamente observaron una reacción positiva frente a la S-100 en la glía de Müller de retinas humanas con uveitis, comentando el posible papel inmunoactivo de estas células. Esta reacción también fue encontrada en otras situaciones de tejido nervioso patológico, como en cerebros con malformaciones (KATO, 1992) o en tumores (MESSMER, 1984).

1.2.4.1.2.- Formación de la cicatriz glial.

Las alteraciones provocadas por patologías o las lesiones que afectan directamente al tejido nervioso pueden provocar la muerte celular fundamentalmente de neuronas y por tanto la presencia de restos celulares. Aunque la función fagocítica de estos restos celulares es fundamentalmente atribuible a las células microgliales, también se han observado residuos picnóticos en el interior de células astrocitarias y células de Müller formando fagosomas (HOGAN, 1963a; MUCHNICK, 1981; PENFOLD, 1986) lo que apoyaría el papel fagocítico desempeñado por estas estirpes gliales. Así, se ha detectado una alta actividad de determinadas enzimas degradativas como las hidrolasas lisosomales presente en los astrocitos (HOF, 1985). Además de la muerte celular después de una lesión tisular, en el caso del tejido neural, se destaca la formación de una cicatriz glial, donde los astrocitos "reactivos" están implicados como ya se ha señalado anteriormente dentro de las funciones de las células macrogliales.

En el caso de los tejidos neuronales del ojo, los primeros estudios fueron de Wolter en 1955 (WOLTER, 1955a) quien observó que las células astrogiales de la retina de un ojo glaucomatoso se encontraban hipertrofiadas, formando una cicatriz astrogial. Otras características de la cicatriz glial son la proliferación astrocitaria, vascular y el aumento en la expresión de determinadas proteínas como la PGFA. Esta sobreexpresión de la PGFA puede ocurrir en ausencia de proliferación glial y entonces estar relacionada con la hipertrofia astrocitaria (HUMPHREY, 1997; HERNÁNDEZ, 2000).

La proliferación tanto glial como vascular es la causa de la formación de membranas peri y epirretinianas, estructuras muy frecuentes en patologías como la retinopatía diabética, hipertensiva, desprendimientos de retina, etc... (ALGVERE, 1983; GOLDARACENA, 1992; LAQUA, 1975; MILLER, 1986; NORK, 1987; OHIRA, 1990; VAN HORN, 1977). La explicación de los factores que

desencadenan esta proliferación glial y la formación de estas membranas es controvertida. Varios autores opinan que la rotura de la barrera hematorretiniana o la presencia de hemorragias, es lo que provoca la liberación de moléculas plasmáticas como la trombina o fibronectina, responsables de la proliferación glial (PURO, 1990, 1991) y la formación de las membranas. Según otros autores son las células de EPR las que sintetizan el factor de crecimiento fibroblástico y lo liberan a la superficie retiniana y al vítreo, estimulando el crecimiento y la migración de los astrocitos (PURO, 1991; ROWENS, 1985).

Como ya se ha señalado anteriormente, los astrocitos se convierten en "reactivos" como respuesta al daño neuronal. La implicación de esta estirpe glial y una gran variedad de proteínas intra y extracelulares expresada por ellos en la neuropatía glaucomatosa en humanos y en monos ha sido estudiada y revisada por Hernández y col. en el año 2000 (HERNÁNDEZ, 2000). Este trabajo destaca un aumento de la inmunoreactividad PGFA y que éste no decrece cuando la cicatriz glial se ha formado, sino que continúa evidente, sugiriendo la posibilidad de una reactivación astrocitaria. De hecho considera que no existe una verdadera cicatriz glial ya que no hay invasión de células inflamatorias procedentes de la sangre, como ocurre en los procesos cicatriciales del resto del SNC.

La relación entre los astrocitos y esta patología ocular presenta varios aspectos en discusión. Por una parte, la posible implicación de los astrocitos en las alteraciones axonales y muerte neuronal, y por otra, el papel que desempeñan en los procesos reparadores del tejido nervioso dañado. Con respecto a la primera cuestión, Hernández (HERNÁNDEZ, 2000) expone que los astrocitos "reactivos" pueden alterar el microentorno de la cabeza del NO mediante la síntesis y liberación de diferentes moléculas al exterior celular. Esta remodelación de la MEC sería la responsable de la degeneración axonal y las alteraciones progresivas e irreversibles características de esta patología ocular. Los astrocitos "reactivos" en la neuropatía óptica glaucomatosa humana y en un modelo en ratas tienen la capacidad de sintetizar la enzima óxido nítrico sintasa generando una gran cantidad de óxido nítrico, que puede resultar neurotóxico para los axones de las células ganglionares retinianas. En opinión de Morgan (MORGAN 2000), las alteraciones que sufren los axones de las células ganglionares en esta patología están directamente relacionadas con el daño que sufren en primera estancia los astrocitos y no directamente los axones como se pensó en un primer momento (TRIVIÑO 1996, MORGAN 2000). Por lo tanto es el daño infringido a la astroglia el que modula la muerte celular en patologías como la neuropatía óptica compresiva y alteraciones isquémicas.

El otro aspecto en discusión es la implicación de estas células astrocitarias en la reparación del tejido nervioso. Los astrocitos "reactivos" y las moléculas que les rodean pueden o bien impedir o bien facilitar la regeneración de los axones dañados. En opinión de Ridet (RIDET, 1997), la gliosis puede favorecer la regeneración axonal, ya que los astrocitos forman una barrera que aísla el tejido neuronal no afectado de lesiones secundarias mientras que para Hernández, (HERNÁNDEZ, 2000) los propios astrocitos y los cambios que provocan en su entorno, además de ser los responsables de la degeneración axonal, son los que impiden los procesos reparadores, como la propia regeneración neural.

La implicación de la astrogliosis en los procesos patológicos o degenerativos ha sido puesta de manifiesto por los estudios del grupo dirigido por Ramírez y Triviño en el año 2001 (RAMÍREZ, 2001). En este trabajo con microscopía electrónica e inmunohistoquímica, se comparó la morfología y distribución de los astrocitos en retinas humanas de adulto, de ancianos y de personas con degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Los resultados más destacables observados en las retinas de las personas ancianas, además de presentar depósitos de lipofucsina, se detectó una variación en la intensidad y distribución del marcaje inmunorreactivo frente a PGFA. Así la inmunorreactividad frente a PGFA era mayor que en las retinas de adultos, observándose una disminución significativa de células que forman el plexo astroglioso con forma de panal en la CCG, así como la existencia de espacios sin marcaje en la CFNO. Las alteraciones que se observaron en las retinas con DMAE eran vasculares afectando a los capilares retinianos y gliales, donde los astrocitos aparecían hipertróficos fagocitando a las células ganglionares muertas. Destaca la presencia fundamentalmente en la región central de la retina de células con un grueso cuerpo celular altamente inmunorreactivo con procesos que emergen desde la CFNO hacia el humor vítreo. En algunas zonas, este tejido PGFA + formado por astrocitos y células de Müller forman una membrana epirretiniana situada entre el humor vítreo y la MLI. Esta lesión en sus últimos estadios puede provocar la rotura de la membrana de Bruch y neovascularización.

Utilizando la microscopía electrónica, se observa el aumento de orgánulos intracelulares en los astrocitos de retinas de ancianos frente a las de los adultos, indicando una mayor actividad metabólica. Estos astrocitos con mayor actividad metabólica y con una mayor densidad de filamentos intermedios son astrocitos reactivos cuya función es proteger a las neuronas del daño oxidativo. La isquemia retiniana extensa que puede ocurrir con la DMAE junto con la disminución en el número de astrocitos observada en los procesos normales de envejecimiento, provoca la muerte de las células ganglionares que no pueden ser protegidas frente al daño oxidativo.

1.2.4.3.- Respuesta microglial.

Ya hemos indicado las modificaciones que sufre la microglía al hablar de su función migratoria y fagocítica, que se desencadena en los tejidos patológicos o dañados. Además del primer estudio en cerebro y cerebelo de Del Río-Hortega, su discípulo López Enríquez como ya hemos señalado anteriormente, se dedicó al estudio de esta estirpe glial en la retina y otros componentes de la vía óptica. Este autor con la misma técnica al carbonato de plata amoniacal, describe las transformaciones morfológicas de la microglía, hasta formar células en bastoncillo y corpúsculos granuloadiposos, transformaciones que no repetiremos ya que el autor indica que la microglía retiniana presenta idénticas actividades fagocitarias que las que ocurren en otros centros nerviosos.

El trabajo de López-Enríquez revisó los estudios que describieron más detalladamente los cuerpos granuloadiposos y la existencia de ciertas células en las retinas afectadas de distintas patologías, que en un principio se les otorgaban diferentes orígenes, pero que posteriormente cuando se las observó interviniendo en la fagocitosis, fueron identificadas como células microgliales

(LÓPEZ-ENRÍQUEZ, 1926, 1927). En la revisión de este autor, se hace referencia a los estudios de Türk en 1850 quien señaló por primera vez la presencia de cuerpos granulosos en la retinitis albuminúrica, observaciones corroboradas por Heymann, Virchow y Wagner en la misma afección, así como por Bowman en la oftalmía metastásica (corpúsculos de exudación). Posteriormente, Müller en 1858 y especialmente Nagel en 1860, estudiaron detalladamente los cuerpos granuloadiposos, no apreciando relación alguna entre ellos y los vasos, en opinión de Nagel y creyéndolos formados, tomando como ejemplo Virchow, por células neuróglícas.

Amman y Kunz en 1897, observaron estos cuerpos en la retinitis circinata y albuminúrica, localizándolos concretamente en la capa de los fotorreceptores, de gran tamaño, con morfología en forma de huso, núcleos en forma de bastoncito y largas ramificaciones protoplásmicas. En la neuritis óptica intersticial, fueron descritos por Bielschowsky y Greef (1902-1906) cargados de cuerpos lipídicos, siendo interpretados como leucocitos alterados. En 1905, estudiando la neuroglía retiniana y sus modificaciones patológicas se otorgó a estos corpúsculos con granulaciones pigmentarias o lipídicas un origen neuróglíco. En 1915 Leber estudia atentamente las características y origen de estos elementos granulosos y pigmentarios que aparecen en la retinitis albuminúrica, otorgándoles una procedencia desde el epitelio pigmentario de la retina ya que no encuentra indicios de transición entre estos elementos y la neuroglía, rechazando el origen leucocitario. Otros autores confirmaron las observaciones de Leber (Ginsberg y Rochon-Duvigneaud en 1912) aunque no aportaron datos importantes.

Todos estos estudios de los corpúsculos granuloadiposos concluían atribuyéndoles diversos orígenes, hasta que López-Enríquez revela la función fagocitaria de la microglía en diversos procesos inflamatorios en las vías visuales y sus transformaciones morfológicas hasta formar los cuerpos granulosos con todos sus aspectos intermedios, semejantes a los observados en las encefalitis y mielitis. López-Enríquez realiza una detallada descripción de estas células en casos de endoftalmitis séptica, retinitis exudativa avanzada concluyendo que la transformación de forma estelar con finas ramificaciones a los tipos tuberosos y redondeados de morfología tan diferente, han confundido al resto de los autores que no pudieron encontrar las diferentes formas intermedias que se recogen recorriendo las preparaciones.

Por último, sus estudios en los procesos inflamatorios de las vías ópticas fueron más escasos, concluyendo que aunque la microglía en el NO y quiasma suele ser escasa en comparación con la neuroglía, aparece un notable aumento en la cantidad de estas células microgliales en procesos patológicos, concretamente inflamatorios. Después de los importantes trabajos de López-Enríquez sobre la microglía retiniana, J. Reimer Wolter (1956-1959) (WOLTER, 1956b, 1959) realiza grandes aportaciones en este sentido destacando el origen mesodérmico de estas células, y se centra en el estudio de los corpúsculos granuloadiposos (Gittercells) cargados de lípidos cuya acumulación en la capa de las fibras de Henle, los hace responsables de la estrella macular,

observación clínica en la retinopatía esclero-hipertensiva, también observada en la retinopatía diabética (WOLTER, 1957,1958).

Wolter (WOLTER, 1960) también observa células microgliales en el vítreo en condiciones patológicas exudativas o hemorrágicas que proceden de la retina y atraviesan la membrana limitante interna. En el vítreo pierden su forma ramificada, ya que no tienen problemas de espacio al cual adaptarse, contrariamente a lo descrito por Vrabec en 1975 (VRABEC, 1975), adquiriendo una disposición globular y en panal cuando comienzan a fagocitar. Estas células cargadas de desechos se acercan después a zonas vascularizadas en la retina, donde degeneran y liberan al torrente sanguíneo su contenido, por lo que en ese momento pierden sus afinidades tintoriales para las grasas.

Estos trabajos fueron confirmados por Vrabec quien, a finales de los 60 y comienzos de los 70, describe la microglía retiniana en el mono y conejo (VRABEC, 1968 y 1969) distribuida en paralelo a los vasos sanguíneos, en contacto íntimo con ellos, por lo que en situaciones normales, el mayor número de células microgliales se localiza en las capas plexiformes (VRABEC, 1970). Describe las transformaciones de la microglía en retinas patológicas humanas para formar corpúsculos granuloalipos, observando que los cambios más avanzados en estas células se producen en las zonas circundantes de las hemorragias intraparenquimatosas retinianas, describe además otras variedades de macrófagos retinianos, como los macrófagos propiamente dichos en las zonas vecinas a los capilares. En los casos de retinitis exudativa externa habla de células del EPR, que pierden sus granulaciones y se vuelven esféricas e hinchadas con su núcleo en la periferia y que poseen función fagocitaria denominándolas células fantasma. Por último, en casos de perforaciones oculares, describe células astrocíticas con material granular que denomina también fagocitos retinianos (VRABEC, 1945). En las retinas patológicas, Vrabec describe que la distribución de la microglía supera las plexiformes, como en el caso de retinas normales, y alcanzan cualquier otra capa retiniana, observaciones confirmadas posteriormente por Gallego. Así, en melanomas uveales las observa en el líquido subretiniano, es decir, atravesando la membrana limitante externa.

Gallego en 1972 (GALLEGO, 1976), estudiando la microglía de la corteza cerebral del gato, confirma las observaciones de Mori y Leblond y describe por una parte una microglía intersticial de la sustancia gris, alejada de los vasos y rodeada por astrocitos; y por otra, una microglía perivascular o pericitaria. Cuando el pericito abandona su celda pericitaria y penetra en el sistema nervioso central donde, se convierte en microglía intersticial; lo que apoya el origen pericitario de la microglía. En 1964 Gallego había identificado un nuevo tipo celular en la retina de mamíferos no primates, que denominó células horizontales desprovistas de axón (GALLEGO, 1964), y en 1975 describió estas células en monos., Pocos años después el autor rectifica esta observación en primates demostrando que son células microgliales dispuestas en un plano en la CPE de estos animales (GALLEGO, 1976). Mientras que en retinas patológicas la microglía se dispone de forma anárquica en toda la retina, la localización en la CPE es paralela a los cuerpos sinápticos de los fotorreceptores con procesos

colaterales dirigidos hacia los pies de éstos, lo que le hizo confundirlas con células horizontales. Luego comprobó que ninguna colateral de la microglía penetraba en las triadas de los conos ni en los complejos sinápticos de los bastones, condición que era necesaria para considerarlas células horizontales desprovistas de axón. Una confusión similar apareció de nuevo en trabajos de R.W. West en la retina de ardilla, quien en 1978 denomina células horizontales (WEST, 1978) a elementos celulares que él mismo demuestra con MET que carecen de conexiones con los fotorreceptores. Así, en 1981 Boycott y Hopkins (BOYCOTT, 1981) demuestran que las colaterales microgliales de la CPE no participan en las conexiones sinápticas de los fotorreceptores y que las supuestas células horizontales de West eran, por tanto, células microgliales.

En 1986, Tarrés y Gallego (TARRÉS, 1986) retoman el tema de los dos tipos celulares destacando una serie de diferencias morfológicas para evitar confusiones entre estos dos tipos celulares. Las células horizontales sin axón muestran en microscopía óptica un patrón de ramificaciones muy regular con terminaciones muy finas engrosadas al final y agrupadas en racimos; con la microscopía electrónica se observa que sus terminales sinápticas se introducen en los pies sinápticos de los fotorreceptores. La microglía, en cambio, muestra engrosamientos a lo largo de sus ramificaciones que terminan en unas estructuras cortas, globosas, engrosadas, dirigidas no sólo hacia las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores, sino en todas las direcciones, e independientes estructuralmente de los contactos sinápticos de los conos y bastones (GALLEGO, 1986; TARRÉS, 1986). En el mismo trabajo, explica que la carencia de células microgliales en retinas normales a nivel de los pies sinápticos de los fotorreceptores se debe a la barrera que forma la estrecha unión entre éstos con gap-junctions (zónula adherens). Ling en 1982 (LING, 1982), estudiando la microglía en retinas de ratas, había dado un enfoque funcional a esta idea argumentando que a este nivel no es necesaria una actividad fagocitaria porque ya la ejercen las células del epitelio pigmentario. En 1990 un discípulo de Gallego, F.M. Martín (MARTÍN, 1989), describe en su tesis doctoral, la distribución de la microglía retiniana de ratas, conejos, gatos, perros, pollos y monos, tanto en condiciones normales como patológicas. El autor las diferencia de las células horizontales desprovistas de axón, confirma el origen pericitario de la microglía expuesto por Gallego y describe formas de transición entre pericitos y microglía. Adjudica al pecten de las aves una función defensiva, por ser el soporte vascular de la retina y por tanto estructura originaria de microglía. En su estudio confirma que utilizando la técnica inmunohistoquímica de la tiaminopirofosfatasa (TPPasa) (TERUBAYASHI, 1984) se consigue una tinción más específica y selectiva de la microglía.

El marcaje inmunoenzimático de la microglía con NDPasa fue también utilizado por Schnitzer y Scherer en 1990 (SCHNITZER, 1990) para estudiar su respuesta a la transección del NO en la retina de conejos. Observaron que el número de células microgliales y la intensidad de su marcaje aumentaron pocos días después de la sección del NO, tanto en la CPI como en la CFNO. En las primeras semanas después de la lesión, la distribución biestratificada en mosaico de estas células estrelladas en la CPI no cambió, pero los procesos celulares aparecían más cortos y gruesos,

ocupando por tanto un menor espacio. La microglía de la CFNO, dispuesta en paralelo a los axones que están degenerando debido a la transección del NO, mostró un aumento en el número de procesos celulares. Por último, en la CPE, donde sólo excepcionalmente aparecen células microgliales, su presencia y el número de procesos provenientes de la CPI fue mayor en las retinas de los ojos lesionados. Todos estos cambios desaparecieron a los 5 meses después de la lesión y las células microgliales se mostraban similares a las de la retina normal.

La respuesta de la microglía frente a la transección del NO también fue estudiada por Thanos y col. en 1992 en ratas (THANOS, 1992), utilizando como marcador enzimoquímico de la microglía en reposo la trifosfato pirofosfatasa (TPPasa), de la microglía activada la vimentina, y de la progresiva degeneración de las células ganglionares en la retina axotomizada un marcador fluorescente retrógrado. Se estudiaron retinas desde el segundo día hasta el tercer mes posterior a la lesión. La incorporación de marcador fluorescente al interior de la microglía, indicativo de la fagocitosis de células ganglionares necróticas, apareció de forma paralela en tiempo y espacio a la degeneración de las células ganglionares, comenzando en la CFNO y posteriormente en la CCG y la CPI. Las células microgliales marcadas se observaron en la retina afectada hasta tres meses después de la lesión. Estos resultados confirman el importante papel que desempeñan las células microgliales en la reparación de lesiones por axotomía así como la retirada de desechos celulares.

Las glicoproteínas celulares están implicadas en la diferenciación y comunicación celular y además su marcaje con lectinas es muy útil para la detección de algunas estirpes celulares como la microglía o estructuras especiales como la unión del EPR y los fotorreceptores. En las retinas normales, la distribución y localización de los sitios de unión a lectinas que determinan la presencia de determinadas glicoproteínas de las células fotorreceptoras y del EPR indican la integridad funcional y estructural de este complejo de unión. En 1994, Bopp y col. (BOPP, 1994) compararon los patrones de unión a lectinas del complejo EPR-fotorreceptor en retinas humanas normales y patológicas. Los ojos con afectación de la retina externa o desprendimientos de retina, presentaban alteraciones en el complejo EPR-fotorreceptor detectables por los cambios en el patrón de marcaje con lectinas de ambos tipos celulares. En los casos con desprendimiento de retina, el complejo EPR-fotorreceptor ya no representa una unidad anatómica y funcional y cada tipo celular presenta un modelo individual de reacción. Lo más notable es la gran capacidad reactiva (proliferación, migración y pseudometaplasia) del EPR, que pierde sus características epiteliales y adopta propiedades mesenquimales. Es de destacar el aumento del marcaje con determinadas lectinas en la porción apical de las células del EPR localizadas en la membrana de Bruch que coincide con el detectado en estirpes celulares con características de macrófagos. Los autores relacionan el aumento del marcaje con un incremento de la actividad metabólica de estas células, aludiendo a su elevada actividad fagocítica ya conocida.

Humphrey y Moore estudiaron en 1996 (HUMPHREY, 1996) la respuesta microglial al daño originado por fotocoagulación retiniana en conejos, con la intención de compararla con la de la glía

de Müller, habían estudiado y publicado previamente en 1993 (HUMPHREY, 1993). Utilizaron el láser de argón y observaron los resultados en montajes planos de retina con inmunohistoquímica para PGFA, marcador positivo de la glía de Müller dañada, la enzima NDPasa, marcador de microglía, y neurofilamentos fosforilados, marcador de la reacción neuronal. Después de la fotocoagulación con láser la distribución normal de la microglía que se localiza fundamentalmente en la CFNO, CPI y CPE, varía reaccionando en cada capa de forma diferente, lo que indica que la respuesta microglial podría estar modulada por factores locales como los elementos celulares dañados o señales difusibles. En la CFNO, donde en condiciones normales la microglía presenta pocos procesos y tiene forma alargada siguiendo el curso de los haces axonales, tras la fotocoagulación intensa que produce daños neuronales (observados con la inmunohistoquímica de neurofilamentos fosforilados) aparece una respuesta tardía (entre 1 y 3 semanas) de aumento del marcaje con NDPasa, fundamentalmente en los axones degenerados de la región cercana a la lesión. En la CPI, a las 2 horas postfotocoagulación, en torno a la lesión hay células microgliales NDPasa reactivas sin ninguna prolongación y este núcleo lesional está rodeado por muchas células microgliales con gran parte de sus prolongaciones apuntando hacia el centro. A las 6 horas se observa una desaparición casi total de las células microgliales y procesos en la zona inmediatamente adyacente a la lesión y entre 24 y 48 horas las células microgliales cercanas ocupan esta región vacante orientando de nuevo sus procesos hacia la zona dañada. A la semana, esta zona está completamente ocupada por las células vecinas que migraron y a las 2-3 semanas todas las lesiones presentan células estrelladas que rodean a un núcleo de células NDPasa globulares sin prolongaciones. En la CPE la densidad y distribución de células alrededor de la lesión fue máxima entre 24 y 48 horas en todos los casos, con algunas variaciones con respecto a la situación de la lesión (dorsal o ventral). A las 24 horas, la mayoría de las células marcadas se encontraban fuera del anillo vacante de la CPI, lo que representa reacciones diferentes. A las 48 horas, las células estaban localizadas muy cerca del núcleo de la región. La mayoría de las células de la CNE estaban muy ramificadas en un anillo rodeando a la lesión, y sólo algunas células cercanas a la lesión presentaban morfologías simples similares a las observadas en la CPI. La reacción microglial en la CFNO se limitaba a la zona con axones degenerados, en la CPI alcanzaba hasta dos o tres diámetros celulares llegando a hasta algunos milímetros en la CPE, mientras que la reacción de la glía de Müller alcanzaba varios milímetros y persistía al menos un mes, lo que indica que la correlación de la respuesta de la glía de Müller y microglía es pobre, excepto en el núcleo de la lesión y durante la degeneración Walleriana en la CFNO.

En 1999, Neufeld (NEUFELD, 1999) estudia la microglía en el NO humano en condiciones normales y en globos oculares glaucomatosos. En estos últimos, la microglía aparece activada y con cambios en su distribución. La microglía activada ameboide podía encontrarse en agrupaciones formando parte del parénquima nervioso y aunque se encuentra muy relacionada con los vasos sanguíneos, no forma asociación con ellos. En la zona de la lámina cribosa, se localiza en círculos concéntricos alrededor de los vasos sanguíneos sugiriendo a los autores un papel protector de la barrera hematorretiniana en esta zona.

Recientemente, Sobrado-Calvo y col (SOBRADO-CALVO, 2007) estudiaron mediante marcaje con NDPasa la respuesta microglial retiniana tras la axotomía del nervio óptico de la rata en comparación con la microglia retiniana en situación no traumática, que sitúan a esta estirpe microglial en la CFNO, CCG y plexiformes. Mostraron que tanto la microglía del ojo que ha sufrido el daño en el NO, como en el contralateral, la microglía presenta un intenso grado de activación señalado por su intenso marcaje. Mediante la inyección intravítrea de distintos factores neurotróficos como el factor del crecimiento derivado del cerebro, factor de crecimiento neuronal y neurotrofina 3 en el ojo afectado, se estimulaba la proliferación de esta microglía activada, mientras que el factor inhibidor de macrófagos no producía ese efecto.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las primeras observaciones que mostraban que la luz solar podía provocar efectos en los ojos tales como la ceguera, sirvieron para que se pensara que las radiaciones en forma de luz podían aplicarse a la oftalmología.

Hace aproximadamente 50 años que la tecnología nos ofreció un instrumento capaz de emitir rayos luminosos potentes y controlados en diferentes longitudes de onda, el láser. Este hecho desarrolló los estudios experimentales y clínicos con el objetivo de establecer tanto las posibilidades como las limitaciones de este aparato para el tratamiento de diferentes patologías oculares.

Los láseres de naturaleza gaseosa (argón, kriptón, helio-neón) han sido sustituidos por láseres sólidos, como el láser de diodo, con grandes ventajas en cuanto a la selección de longitud de onda, pequeño tamaño, fácil mantenimiento, alta eficacia y bajos costes.

Previamente a la aplicación terapéutica de cualquier tecnología en humanos, son necesarios estudios experimentales para definir su alcance, condiciones de aplicación y limitaciones. Las investigaciones previas al fototratamiento de cualquier patología ocular deben ayudar a seleccionar la longitud de onda más deseable para optimizar la transmisión de los medios oculares, la absorción por el tejido diana y la producción del mínimo daño a los tejidos sanos del entorno. Asimismo, aunque no está claro si el efecto terapéutico de la fotocoagulación es debido únicamente a la destrucción del EPR o a la destrucción conjunta del EPR y los elementos neuronales de la retina más interna, sí parece cierto que la máxima conservación de la retina neural del polo posterior es deseable para el mantenimiento de la visión. Por ello, los estudios experimentales en general, se han centrado en la descripción de las lesiones y los efectos provocados por la fotocoagulación en las células nerviosas (fotorreceptores, bipolares y ganglionares) como transmisores de la información visual. Son muy pocos los trabajos que complementan esta valiosa información con el estudio del resto de las especies celulares que conforman la retina (especies gliales) y que se ha demostrado que son fundamentales en la recuperación de los propios tejidos nerviosos dañados y por tanto de su funcionalidad.

Por estas razones, esta tesis tiene dos objetivos fundamentales:

- estudiar y describir en un modelo experimental la extensión e intensidad de las lesiones histológicas provocadas por el láser de diodo aplicado con parámetros terapéuticos
- complementar este estudio básico descriptivo con el estudio inmunohistoquímico, mediante técnicas de marcaje selectivo de células gliales, de la evolución de las lesiones en el tiempo y la participación de las diferentes estirpes gliales presentes en la retina en los procesos de cicatrización y reparación de los tejidos afectados.

Está ampliamente aceptado que las células gliales participan activamente en la limpieza, regeneración y cicatrización de las lesiones del tejido nervioso, sin embargo son pocos los estudios realizados en esta región tan particular del sistema nervioso que es la retina. Las dificultades de manejo, preparación y tinción del tejido retiniano, y los problemas añadidos de marcaje inmunohistoquímico hacen que sean escasos los estudios de la participación de estas estirpes gliales y la descripción de la evolución de las lesiones por fotocoagulación en el fondo ocular.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- CARACTERÍSTICAS DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este estudio se han utilizado los globos oculares de conejos pigmentados (*Oryctolagus cuniculus*), realizándose la fotocoagulación en el ojo derecho y manteniendo el ojo izquierdo como control. Los animales tenían edades comprendidas entre 4 y 5 meses y un peso medio de 3,5-4 Kg, y procedían del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Los conejos fueron mantenidos con las condiciones ambientales necesarias (SAINZ, 1983): ciclos luz/oscuridad de 12 horas, temperatura constante entre 20-23°C, comida estandarizada y agua ad libitum.

Durante toda la experimentación con los animales, tanto en su manejo, como cuando se procedió a su tratamiento con el láser y posterior sacrificio, se siguieron las normas éticas y los consejos dictados por el Conseil Canadien de protection des animaux (http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/toc_v1.htm), y la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (publicados anualmente en la revista Invest. Ophthalmology and Visual Science).

En la anatomía del fondo ocular del conejo pueden diferenciarse fácilmente, mediante oftalmoscopia simple, dos zonas anatómicas con rasgos estructurales distintos:.

- *Zona de los radios medulares*: Esta es la única zona vascularizada del fondo ocular del conejo. Se visualiza oftalmoscópicamente como unos flecos que parten de ambos lados de la papila óptica y se orientan radialmente hacia la zona inferior. Estos radios están formados básicamente por vasos sanguíneos epi-retinianos rodeados de elementos nerviosos. La oligodendroglía envolvente y los vasos sanguíneos aparecen sólo en esta estructura y están ausentes en el resto del fondo ocular.
- *Zona avascular de la retina*: El resto de la superficie del fondo ocular, carece de vasos y de oligodendroglía. Estas dos peculiaridades también están presentes en la zona macular humana, por ello el fondo avascular del globo ocular del conejo es frecuentemente utilizado como modelo experimental de esta estructura humana.

3.2.- APLICACIÓN DEL LÁSER DE DIODO

Previamente al proceso de la fotocoagulación, los animales fueron anestesiados intramuscularmente con una solución de atropina (0,23cc/Kg), clorhidrato de dihidro-tiazina (0,31cc/Kg) y ketamina

(0,46cc/Kg), y mantenidos con una vía intravenosa para la administración durante la operación del anestésico pentobarbital sódico (30mg/Kg) en la vena de una de sus orejas. Sus pupilas fueron dilatadas con solución de tropicamida al 1 %.

El láser de diodo utilizado fue el modelo Oculight de Iris Medical capaz de emitir en modo continuo o en modo micropulsado. La longitud de onda de la emisión de luz fue 810 nm, en la zona del infrarrojo cercano del espectro de radiación. Los parámetros de los impactos que se realizaron en el modo continuo (CW) de emisión de onda fueron los siguientes:

- Potencia: 150 mw
- Duración de la emisión: 200 MSEG
- Tamaño del haz: 200 μ

Se eligieron estos parámetros de potencia, duración de la emisión y tamaño del haz, que definen una cantidad total de energía emitida de 30 mJ por ser los más generalmente utilizados en la bibliografía,

El procedimiento para la fotocoagulación transpupilar comenzó en cada animal una vez que éste estuvo totalmente sedado, con una vía intravenosa en la oreja para mantener el anestésico durante el tratamiento. Se colocó la cabeza del animal apoyada en el soporte de la lámpara de hendidura. Previamente el aparato láser había sido acoplado a dicho instrumento con el objetivo de abordar más fácilmente el enfoque del fondo ocular de los animales.

El investigador, ayudándose de un haz rojo de Helio-Neón de muy baja intensidad como guía para dirigir el haz del láser de diodo, orientó éste hasta conseguir en el fondo ocular del animal una imagen nítida, enfocada y de forma circular.

Para facilitar la localización de los impactos se dividió de forma imaginaria la retina del animal mediante dos ejes perpendiculares con la papila óptica como punto de cruce y se dividió así el fondo ocular en cuatro cuadrantes: superior nasal, superior temporal, inferior nasal e inferior temporal. Esta división en cuadrantes sirvió para dirigir los grupos de impactos y para la identificación y localización de las lesiones durante la fase posterior del estudio histológico.

Los impactos fueron administrados por grupos y distribuidos sobre la retina del modo más uniforme posible. El número de impactos fue entre 8 y 12 por grupo, dispuestos en dos filas de cuatro o seis impactos respectivamente. Los cuatro grupos de impactos se realizaron siempre en el ojo derecho del animal, cada uno en un cuadrante diferente. Así pues, el ojo derecho del animal fue utilizado como experimental, y el izquierdo como control.

- Hemicampo temporal:

Las zonas temporales superior e inferior fueron tratada con los parámetros definidos como de intensidad media (150mw de potencia y 200 mseg de duración), con una energía total de emisión de 30 mJ. En el cuadrante inferior, donde se ubican los radios medulares, se realizaron los impactos también en esta zona.

- Hemicampo nasal:

En el cuadrante superior nasal, se utilizaron los parámetros de intensidad baja (80mw de potencia, 200 mseg de duración de la emisión), cuya energía total emitida era de 15 mJ. En el cuadrante inferior nasal, se localizó el grupo de impactos de intensidad alta (300mw de potencia y 200 mseg de duración), con una energía total de emisión de 60mJ. Algunos impactos también se localizaron en la zona de los radios medulares.

Una vez finalizado el proceso de la fotocoagulación, se esperó a que el animal superara la anestesia adecuadamente para retornarle de nuevo a su jaula. No hubo contacto alguno entre el fotocoagulador y la córnea, por lo que no fue necesario ningún tratamiento preventivo de infección ni se produjo ninguna alteración corneal.

Antes de proceder al sacrificio de los animales, se realizó un control oftalmoscópico del aspecto de los impactos mediante retinografías efectuadas con un retinógrafo Olympus, después de la dilatación pupilar con colirio de tropicamida en ambos ojos. Se constató oftalmoscópicamente los efectos producidos en la superficie retiniana por los impactos del láser consistentes en cambios de coloración que variaban desde el gris al blanco dependiendo de la intensidad utilizada.

3.3.- GRUPOS DE ANIMALES

Fueron tratados con fotocoagulación un total de 15 animales. Estos animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos evolutivos, con 3 animales en cada grupo, y fueron sacrificados tras diferentes intervalos de tiempo para estudiar la evolución de la lesión provocada.

Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico a los siguientes tiempos tras la fotocoagulación:

- 3 días
- 7 días
- 15 días
- 30 días
- 60 días

3.4.- FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES

Una vez sacrificados cada animal, tras su correspondiente intervalo postlesión, se enuclearon los globos oculares para su posterior fijación y procesamiento. Ambos globos oculares fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato pH=7,4 (0,1M). Previamente se realizó un tallado de un botón corneal y se extrajo el cristalino para facilitar la rápida penetración del líquido fijador en los tejidos del polo posterior (coroides y retina). Los globos oculares permanecieron en este líquido durante las siguientes 24 a 48 horas a 4°C.

Posteriormente, los globos oculares fueron mantenidos en PBS durante al menos tres periodos sucesivos de tres horas, con el objetivo de lavar los tejidos del agente fijador.

Tras esto, se procedió al corte cuidadoso del polo posterior en dos mitades: lado nasal y lado temporal, evitando que la retina se desprendiera de la coroides subyacente. En los dos hemisferios resultantes la presencia y disposición característica de los radios medulares sirvió para diferenciar la zona superior de la inferior y facilitar la localización de los grupos de impactos en el momento de su sección o tinción.

Estos dos hemisferios (previamente fijados y lavados) fueron sometidos a deshidratación mediante pasos sucesivos en alcohol etílico de concentración creciente (60°, 70°, 80°, 96° y Absoluta) e inmersión en tolueno (como líquido intermedio, miscible tanto en alcohol como en parafina). Finalmente fueron incluidos en parafina plástica Paraplast (Sherwood medical) más un endurecedor PQ7.

Los segmentos posteriores fueron orientados en el bloque de parafina de tal forma que los lados superior, inferior, nasal y temporal de la retina, estaban perfectamente localizados.

El protocolo detallado, para la inclusión fue el siguiente:

- 1.- Inmersión en alcohol etílico de 60° : 2 pases (1 hora, 30 minutos)
- 2.- Inmersión en alcohol etílico de 70° : 2 pases (1 hora, 30 minutos)
- 3.- Inmersión en alcohol etílico de 80° : 2 pases (1 hora, 30 minutos)
- 4.- Inmersión en alcohol etílico de 96° : 2 pases (1 hora, 30 minutos)
- 5.- Inmersión en alcohol etílico de 99° : 2 pases (1 hora, 30 minutos)
- 6.- Inmersión en el líquido intermedio-Tolueno: 3 pases (10min., 10min., 5min.)
- 7.- Baño en parafina: 2 pases
 - 7.1.- De 1 a 2 horas
 - 7.2.- De 30minutos a 1 hora.
- 8.- Inclusión en el bloque de parafina nueva.

3.5.- OBTENCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Una vez incluidas las piezas a estudiar en los bloques de parafina, se procedió al montaje sobre un soporte para su colocación en un microtomo de rotación Reichert-Jung. En cada uno de los 30 bloques, se realizaron aproximadamente 500 cortes, con un espesor entre 5 y 7 micras.

Las secciones obtenidas en grupos de tres a cinco, se depositaron sobre un baño de agua destilada a 35°C donde se estiraron y fueron posteriormente colocadas sobre los portaobjetos.

Para evitar la pérdida de los cortes durante las sucesivas tinciones y lavados, los portaobjetos fueron tratados con inmersión en un baño de gelatina-alumbre de cromo y posterior secado de al menos 24 horas en estufa a 60°.

Debido a que la parafina no es totalmente transparente y para impedir la pérdida de los cortes de la zona tratada, cada 50 cortes aproximadamente, se realizó un control mediante microscopio óptico, capaz de confirmar o descartar la presencia de impactos, incluso en ausencia de tinción. En caso de duda, se realizó una tinción de rutina de un corte para localizar los impactos antes de continuar con el seccionamiento.

3.6.- TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

Esta tinción fue realizada en las secciones obtenidas con el microtomo, tanto para describir los efectos producidos por las diferentes intensidades, como para seleccionar los cortes con impactos y realizar posteriormente con mayor efectividad las tinciones inmunohistoquímicas.

Además de la tinción combinada de la hematoxilina y eosina, se utilizó la tinción con hematoxilina únicamente, que marca los núcleos con un color azul-malva, para contrastar los marcajes celulares obtenidos con las tinciones inmunohistoquímicas.

El protocolo básico de la tinción de hematoxilina-eosina usado incluyó los siguientes pasos:

- 1.- Desparafinado de los cortes en xileno, durante 30 minutos.
- 2.- Posterior hidratación de los cortes mediante baños sucesivos en alcoholes de concentración decreciente: Alcohol absoluto, alcohol de 96° y alcohol de 80°.
- 3.- Lavado en agua destilada: 2 pasos de 10 minutos.
- 4.- Tinción en hematoxilina de Hiss: 5 minutos
- 5.- Lavado en agua destilada: 2 pasos de 10 minutos.
- 6.- Tinción en eosina: 1- 1'5 minutos.
- 7.- Lavado en agua destilada: 2 pasos de 10 minutos.
- 8.- Deshidratación de los cortes mediante baños sucesivos de 5 minutos en alcoholes de concentración creciente: Alcohol de 80°, alcohol de 96° y alcohol absoluto.

Una vez teñidos y deshidratados, los cortes fueron colocados en los portaobjetos y sumergidos en un baño de xileno del que se fueron extrayendo para proceder a su montaje con Dpx y cubreobjetos.

3.7.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.7.1.- MARCAJE DE CÉLULAS ASTROGLIALES CON ANTI-PGFA (PROTEÍNA GLIOFIBRILAR ÁCIDA).

Para marcar los elementos astrogiales se utilizó el anticuerpo frente a la proteína gliofibrilar ácida (PGFA). Esta proteína es un filamento intermedio integrante del citoesqueleto de los astrocitos, que se encuentra casi exclusivamente en estas células, por lo que el marcaje con el anticuerpo frente a esta proteína es muy específico para la identificación y examen microscópico de estas células macrogliales.

Para visualizar en los cortes histológicos este marcaje se utilizó una de las técnicas inmunohistoquímicas más habituales: la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) desarrollada por Sternberger (STERNBERGER, 1970).

Los anticuerpos utilizados en la consecución de esta técnica fueron los siguientes:

- Anticuerpo monoclonal contra la proteína gliofibrilar ácida desarrollada en ratón (anti PGFA, clon GA-5 de Biomakor, Israel; USA, USA)
- Anticuerpo contra IgG de ratón, desarrollado en cabra (anti-mouse IgG; Sigma)
- Complejo peroxidasa anti-peroxidasa, desarrollado en ratón (PAP de ratón, Sigma)

El protocolo detallado que se utilizó se describe a continuación:

- 1.- Desparafinado de los cortes seleccionados con xileno durante 30 minutos.
- 2.- Posterior hidratación de los cortes mediante baños sucesivos en alcoholes de concentración decreciente: Alcohol absoluto, alcohol de 96º y alcohol de 80º.
- 3.- Lavado en PBS, durante 5 minutos.
- 4.- Bloqueo de la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 0,3 %, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Lavado en PBS: 2 baños de 5 minutos.
- 6.- Incubación con suero normal de cabra (*normal goat serum:NGS*) al 10%, durante 1 hora, para la eliminación de la seña de fondo o "*background*".
- 7.- Primera capa: Incubación con anti-PGFA, con una concentración de 1/250, durante 4 horas a 4C° .
- 8.- Lavado en PBS: 3 pasos de 15 minutos.
- 9.- Segunda capa: Incubación con anti-IgG de ratón en una concentración de 1/100, durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 10.- Lavado en PBS: 3 pasos de 15 minutos.

11.- Tercera capa: Incubación con el complejo PAP en una concentración de 1/700, durante 2 horas a temperatura ambiente.

12.- Lavado en PBS: 3 pasos de 15 minutos.

13.- Revelado de la peroxidasa con una pastilla de 3'3'-diaminobencidina tetrahidroclórico (DAB) y una de urea (Sigma) en 5 ml. de agua destilada durante 5 minutos.

14.- Lavado en PBS: 3 pasos de 10 minutos.

15.- Algunas secciones fueron contrastadas con hematoxilina de Hiss durante unos segundos, para poner de manifiesto los núcleos celulares.

16.- Lavado en agua destilada.

17.- Deshidratación de los cortes mediante baños sucesivos de 5 minutos en alcoholes de concentración creciente: Alcohol de 80°, alcohol de 96° y alcohol absoluto.

Una vez teñidos y deshidratados, los cortes fueron colocados en los portaobjetos y sumergidos en un baño de xileno del que se fueron extrayendo para proceder a su montaje con Dpx y cubreobjetos.

3.7.2.- MARCAJE DE CÉLULAS MICROGLIALES CON LECTINAS DE TOMATE

Para visualizar las células de la microglía se utilizó el marcaje inmunohistoquímico con lectinas de tomate, polisacárido con alta especificidad para esta estirpe glial.

El protocolo detallado que se utilizó se describe a continuación:

1.- Lavar en tampón TBS 0,05M, pH: 7,4 (3 x 7 min.)

2.- Inhibición de la actividad peroxidasa endógena (2 horas) en la siguiente solución:

Agua oxigenada al 0,3% en 70% de metanol

Agua oxigenada al 0,3%: 1 microlitro de H₂O₂ (33%) por cada 100 microlitros de H₂O destilada.

3.- Lavar en tampón TBS + 0,5% Tritón X-100 (3 x 5 min)

4.- Eliminación del background (24 horas)

10 % de NGS en TBS + TX-100 0,5%.

5.- Incubar con Lectina de Tomate biotinilada dilución 1:100 en TBS + TX-100 0,5%.

6.- Incubar con Avidina-Peroxidasa diluida 1:400 en TBS + TX-100 0,5%.

7.- Lavados en TBS (3 x 7 min)

8.- Revelado de la Peroxidasa con DAB y urea (Sigma) en 5 ml. de agua destilada.

9.- Lavados en TBS (3 x 7 min).

10.- Lavar en agua destilada durante 5 min.

11.- Deshidratar, aclarar y montar en DPX.

3.8.- OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES A MICROSCOPIA ÓPTICA

Para el examen mediante microscopía óptica de las preparaciones teñidas con las diferentes técnicas, se empleó un microscopio Jenaval (Carl Zeiss Jena) equipado con contraste de fase interferencias (optica de Normarski), contraste de fase en campo claro y oscuro y equipo fotográfico complementario. Se realizaron microfotografías de las distintas preparaciones de retina y se seleccionaron de entre ellas las presentadas en esta tesis.

Los registros fotográficos fueron realizados empleando la película Kodak para diapositivas (400 ASA).

4.- RESULTADOS

Para hacer una descripción detallada de las lesiones observadas post-fotocoagulación se ha tenido en cuenta tres aspectos importantes:

1. La retina del conejo no presenta fovea y es avascular en su totalidad, exceptuando la zona de los radios medulares. Esta región, con forma de alas, se encuentra a ambos lados de la papila óptica. Está compuesta fundamentalmente por los axones de las células ganglionares, que discurren paralelos en la CFNO, y que se encuentran mielinizados. Por lo tanto, en esta zona hay oligodendrocitos; mientras que el resto de la retina es amielínica. Además, en esta zona, aparecen vasos sanguíneos dispuestos sobre la MLI o penetrando en ella, mientras que el resto de la retina es avascular. Por tanto, se describirán por separado las lesiones provocadas por los impactos en los radios medulares y en el resto de la retina.
2. La intensidad de los efectos provocados en el fondo ocular por la fotocoagulación presenta en todos los casos un gradiente decreciente desde el centro del impacto hacia la periferia. En los tiempos cortos posteriores a la fotocoagulación, se han definido tres áreas denominadas zona central, zona intermedia o de transición y zona periférica, porque de este modo se sistematiza y facilita la descripción de los resultados obtenidos (Fig. 1). Sin embargo, a partir de 15 días postratamiento, los hallazgos se han referido a sólo dos zonas: una central y otra periférica al impacto porque realmente las peculiares características de la zona intermedia ya no son diferenciables.
3. Todos los hallazgos han sido agrupados y presentados en relación al intervalo de tiempo desde la lesión experimental hasta el sacrificio del animal. De este modo se obtiene el perfil evolutivo de los efectos de la fotocoagulación.

4.1.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 3 DÍAS

4.1.1. HEMATOXILINA-EOSINA

En la zona central del impacto, se observa que los segmentos externos de los fotorreceptores permanecen adheridos al EPR, que aparece aplanado y conservado, mientras que la retina más interna presenta un importante grado de alteración, afectando a la MLI.

En la zona intermedia, en torno a la zona central, la mayor parte de las alteraciones están situadas en las capas más externas de la retina, y es relativamente escasa la afectación de la retina interna.

En la zona periférica destaca la preservación de la citoarquitectura retiniana tanto en el número, como en la distribución y morfología de las células.

4.1.1.1.- Zona central: (Fig.: 2 y 3)

La MLI presenta diferentes grados de alteración, es discontinua en algunas secciones y no se observan en ella las terminaciones de las células de Müller. La CFNO aparece muy alterada, con aspecto deshilachado. La CCG presenta una disminución en el número de núcleos, tanto de las células ganglionares como de las otras estirpes celulares. La alteración celular es intensa, apreciándose restos celulares dispersos y grandes espacios vacíos.

La CPI muestra importantes alteraciones en la mayoría de los casos. La zona limitada entre las dos capas nucleares, la interna y la externa, incluyendo la CPE entre ellas; presenta un elevado grado de desestructuración. Muchos de los núcleos de esta zona, que corresponden a las células bipolares, células de Müller y fotorreceptores, aparecen picnóticos, más pequeños y redondeados que los de las zonas no tratadas, y se encuentran con frecuencia desplazados de la CNI a la CNE y viceversa, ocupando en este desplazamiento la CPE.

Los fotorreceptores tienen sus segmentos internos rotos, con desechos celulares en los espacios vacíos y con los núcleos desplazados; en cambio los segmentos externos aparecen perfectamente alineados como una empalizada, adheridos a las células del EPR. Es de destacar que la MLE aparece nítida.

Las células del EPR muestran su aspecto aplanado normal, con la MB subyacente conservada y continua.

La coroides sufre un ligero grado de edema, con aumento del número de células y de su tamaño. El desorden pigmentario es notable en comparación con las zonas no tratadas. En el interior de los vasos destaca el aumento en la cantidad de células sanguíneas de la serie blanca y el cierre de la luz vascular, sobretodo de los vasos de menor calibre situados en la CC.

4.1.1.2.- Zona intermedia: (Fig.4)

En las lesiones provocadas por la emisión en modo continuo localizadas en los márgenes de la zona central destaca la gran intensidad y variedad de las alteraciones. Las capas retinianas internas, que comprenden la MLI, CFNO y CCG, presentan desde ligero edema y desestructuración hasta muerte y desorganización celular notable, incluyendo discontinuidades de la MLI.

La CPI aparece bastante conservada y es desde esta capa hacia la coroides donde se localizan fundamentalmente las alteraciones más intensas. Así, a nivel de la CNI, se observa vacuolización y desorden celular que provocan la desestructuración de la capa, aunque son pocos los núcleos que aparecen picnóticos. La CPE adyacente está también ligeramente alterada. Sin embargo, en la CNE la muerte celular es notable, hay una gran disminución del número de núcleos, todos ellos picnóticos, y entre ellos aparecen grandes espacios vacíos y algunos fragmentos celulares dispersos.

A diferencia de la zona central, los segmentos externos de los fotorreceptores aparecen aquí muy afectados y no se puede distinguir la MLE. En las capas ocupadas por los fotorreceptores (CNE, MLE, segmentos externos), y en ocasiones en las cercanías del EPR, aparecen unas células de gran tamaño y con núcleo grande que a veces contienen algo de pigmento. También se ha observado alguna célula con aspecto reticuloide y con estructuras similares a proyecciones citoplásmicas o pseudópodos.

Las células del epitelio pigmentario se encuentran muy alteradas, hipertrofiadas, con el pigmento en la periferia o carentes de pigmento. En algunas secciones se ha detectado la presencia de hematíes. La membrana de Bruch presenta discontinuidades.

A nivel coroideo, lo más notable es el edema, el desorden pigmentario y la proliferación celular. Hay extravasación de hematíes sobre todo a nivel de la coriocapilar y algunas células con aspecto fibroblástico, alargadas orientadas desde la periferia hacia la zona del impacto.

4.1.1.3.- Zona periférica de la lesión (Fig. 5)

En los márgenes de la descrita zona intermedia es notable la conservación de la citoarquitectura normal de la retina.

La MLI, CFNO y CCG se encuentran aún ligeramente alteradas en algunas de las secciones observadas. La CPI y la CNI presentan un alto grado de conservación, aunque en algunas ocasiones se ha detectado la persistencia de un ligero edema de las células bipolares.

La desorganización celular persiste desde la CPE hasta el EPR. Es de destacar la notable picnosis de elementos celulares, así como la gran vacuolización y desorganización celular de esta capa. La alteración presente en los segmentos externos de los fotorreceptores es intensa observando una pérdida y rotura celular destacable, por lo que son abundantes los desechos celulares que ocupan este espacio.

Las células del EPR se muestran conservadas. En esta zona destaca la presencia de alguna célula hiperplásica e hipertrofiada que en alguna ocasión aparece desprovista de su pigmento intracelular.

De igual forma en el espacio entre el EPR y el resto de las capas retinianas aparece alguna célula de morfología redondeada, con un núcleo de gran tamaño que en alguna ocasión presenta pigmento intracelular.

Las alteraciones coroideas son de menor intensidad que en el resto de las zonas del impacto. No aparece un aumento significativo en el número de células y aunque la oclusión vascular persiste en

algún vaso de pequeño calibre, el resto de las estructuras vasculares aparecen conservadas y con una luz del vaso similar a la observada en las zonas no tratadas.

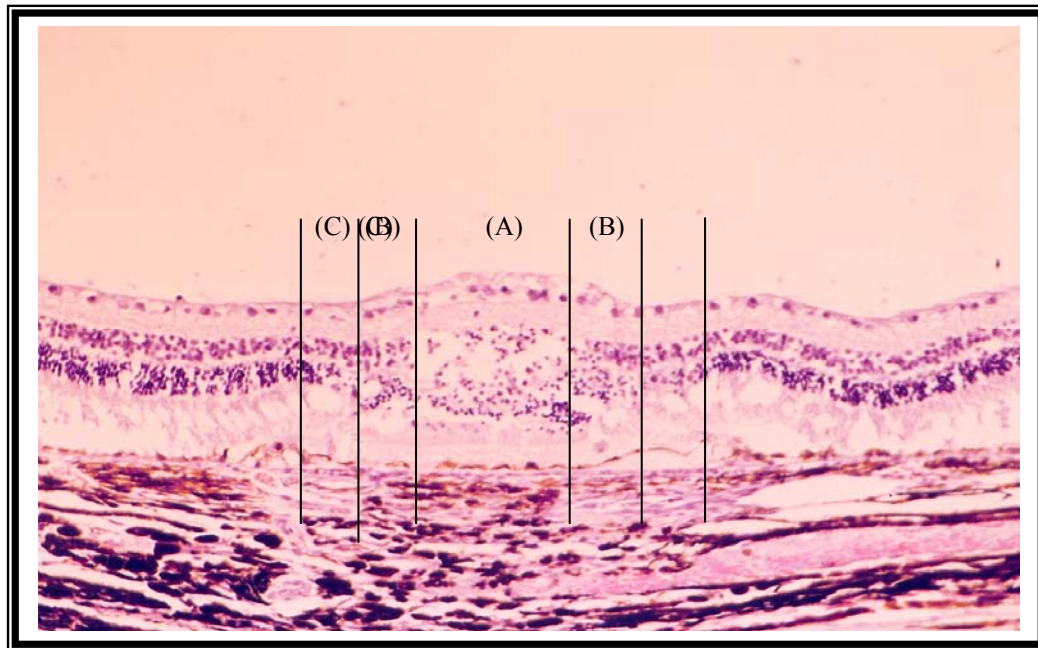


Fig. 1: Visión general de la lesión retiniana 3 días postfotocoagulación. Se diferencian tres zonas: Zona central (A), zona intermedia (B) y zona periférica (C). Tinción H-E (125x)

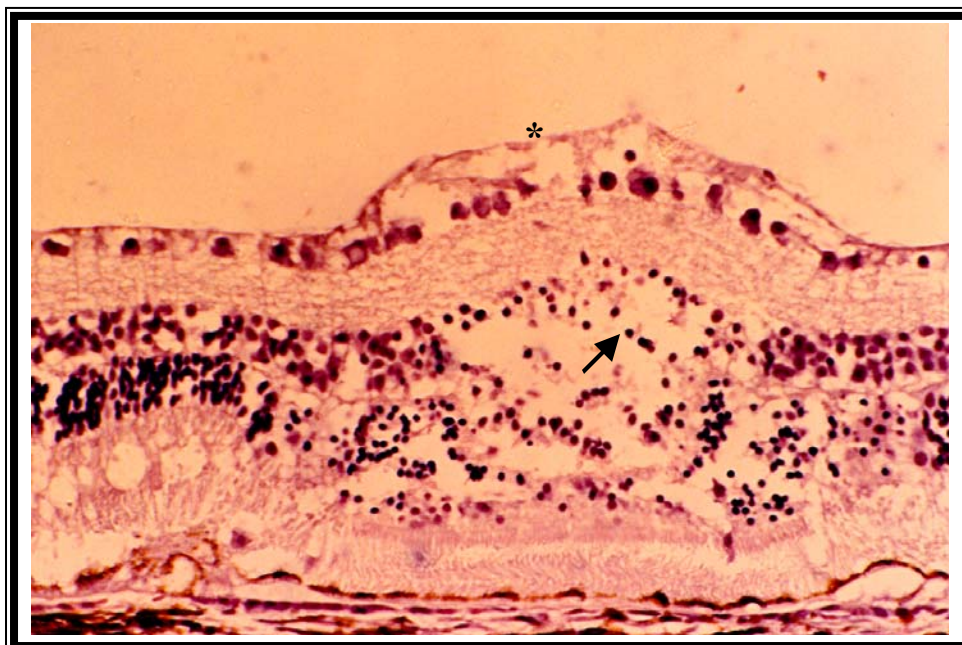


Fig. 2. Zona central de una lesión 3 días postfotocoagulación. La MLI aparece muy alterada y discontinua (*). Desestructuración celular con importante picnosis nuclear (➔). Tinción H-E (250x).

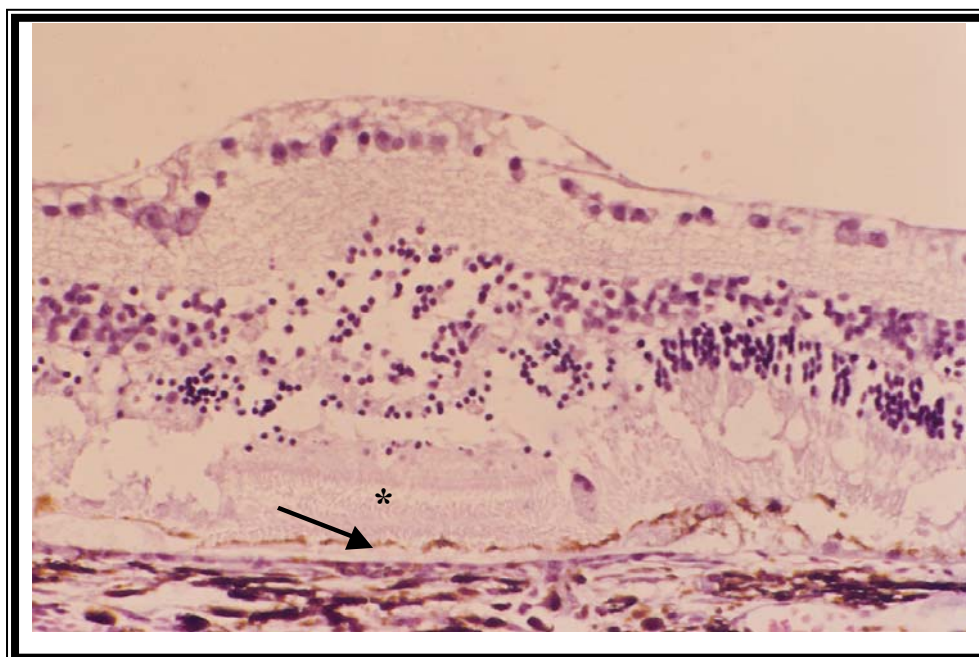


Fig. 3 . Zona central de la lesión 3 días postfotocoagulación. Los segmentos externos de los fotorreceptores aparecen “en empalizada” adheridos al EPR (*). Conservación de las Células del EPR y continuidad de la membrana de Bruch's (—→). Tinción H-E. (250x)

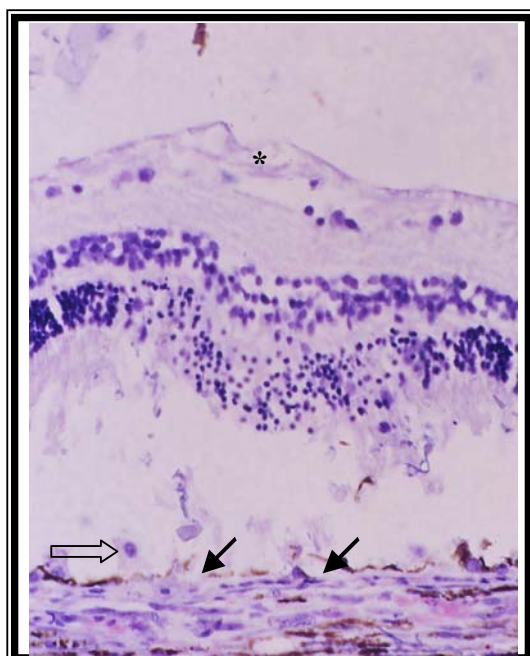


Fig. 4. Zona intermedia de la lesión 3 días postfotocoagulación. Destacan importantes alteraciones de las capas más internas de la retina (*). Célula de aspecto reticuloides (→) y discontinuidades en el EPR y la membrana de Bruch (—→). Tinción H-E (250X)

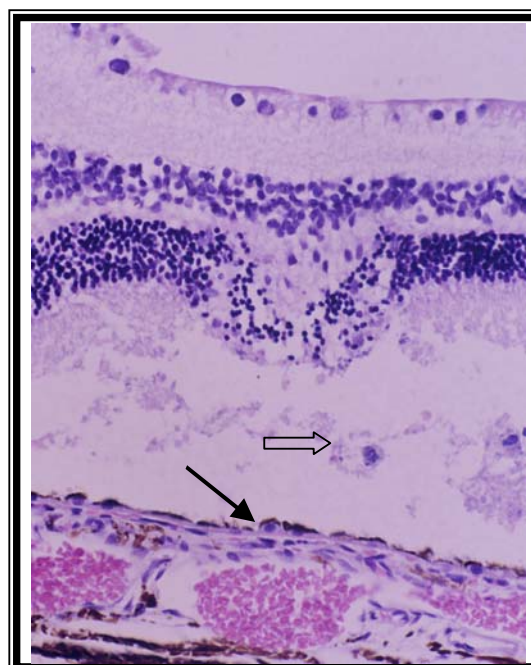


Fig.5. Zona periférica de la lesión 3 días postfotocoagulación. Mayor conservación de las capas más internas (*). En la retina externa, hay gran cantidad de desechos celulares (→). Continuidad del EPR y de la membrana de Bruch (—→). Tinción H-E (250X)

A continuación, en la Tabla 1 se recogen un resumen de los hallazgos histológicos en cada una de las capas, así como una gradación estimada de cada uno de ellos en la zona central, intermedia y periférica.

Tabla 1. Resumen hallazgos histopatológicos 3 días post-fotocoagulación con tinción de hematoxilina-eosina

		AREA DE LA LESION		
HALLAZGOS Y LOCALIZACIÓN		CENTRO	INTERMEDIO	PERIFERIA
MLI	Discontinuidad	++	++	+
CFNO	Edema y desestructuración	+++	+	+
CCG	Alteración celular	+++	++	+
	Muerte celular	++	++	
	Desorganización	+++	++	+
CPI	Alteración	+++	++	+
CNI	Desestructuración	+++	++	+
	Picnosis	+++	+	
	Vacuolización	+	++	+
CPE	Alteración	+++	++	+
CNE	Desestructuración celular	+++	++	++
	Picnosis		+++	++
	Desplazamiento núcleos	+++	+++	++
MLE	Compactación	++		
	Desestructuración		+++	
SEGMENTOS EXTERNOS				
	Disposición en empalizada	++		
	Retinopexia	++		
	Alteración celular (desechos)		+++	++
	Desestructuración		+++	++
EPR	Aplanamiento celular	+++		
	Hipertrofia celular		+++	++
	Presencia de células ameboides		++	
	Presencia de hematíes		++	
MEMBRANA DE BRUCH				
	Discontinua		++	
COROIDES				
	Edema	++	++	+
	Proliferación celular	++	++	
	Hiperplasia celular	++	++	+
	Desorganización pigmentarios	++	++	+
	Oclusión vascular	++	++	+
	Hemorragia		+	

4.1.1.4.- Radios Medulares (Fig. 6 y 7)

La intensidad de 30 mJ provoca en la zona de los radios medulares gran variedad de alteraciones. En algunas secciones la CFNO está engrosada pero poco alterada a diferencia de lo que se observa en el resto de las capas retinianas. Sin embargo, en otras secciones es notable la disminución en el grosor de esta estructura mielinizada.

Independientemente del grado de alteración de la CFNO, el resto de las capas retinianas están muy alteradas. Plexiformes y nucleares no son diferenciables, ya que estas estructuras ocupan un área con un alto grado de desorganización celular ocupada por desechos celulares, núcleos picnóticos y grandes espacios vacíos. Entre esta capa y la coroides, destaca un acúmulo de células de morfología redondeada, notable tamaño, núcleo grande, con pigmento intracelular ocasional.

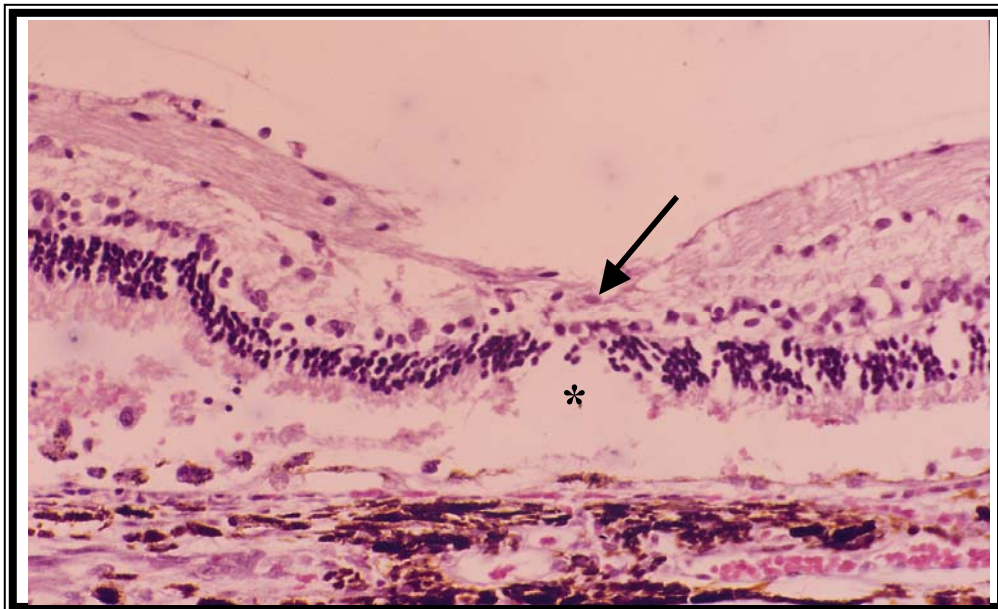


Fig.6. Lesión sobre los radios medulares 3 días postfotocoagulación. Destacable disminución en el grosor de las fibras mielinizadas (→) e importantes alteraciones de las capas nucleares y plexiformes (*). Tinción H-E (250X)

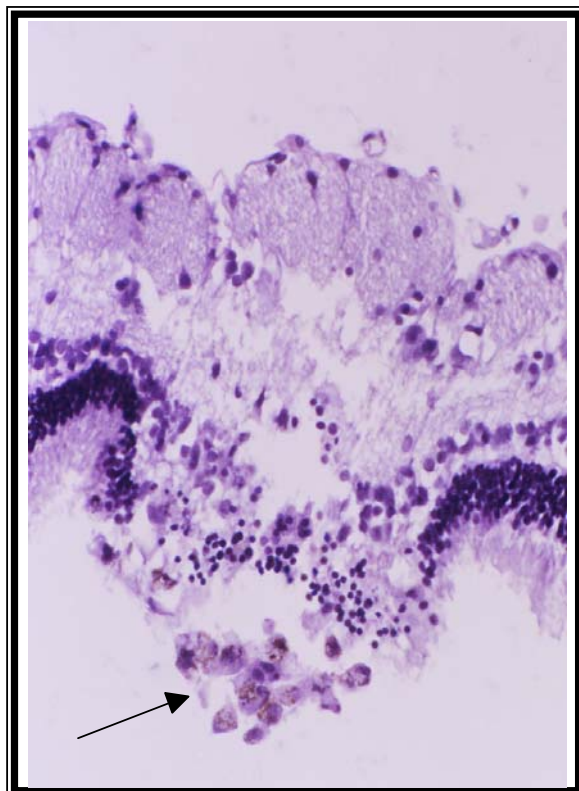


Fig.7. Detalle de la lesión en los radios medulares 3 días post fotocoagulación. Acúmulo de células grandes, redondeadas, en cuyo interior destaca un núcleo grande y acúmulos de pigmento (→). Tinción H-E. (500x)

4.1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

4.1.2.1. PGFA (Fig. 8, 9 y 10)

En las secciones tratadas con el anticuerpo frente a la PGFA, se observa un intenso marcaje en la MLI y la presencia de acúmulos de fibras celulares PGFA (+) paralelas a la MLI y CFNO.

Hay células PGFA (+) en la CCG y CPI, con diferente morfología aunque en todas ellas se aprecia expansión de prolongaciones a partir del cuerpo celular que contiene el núcleo. Estas células PGFA (+) también se observan en las zonas adyacentes al área irradiada.

En el resto de las capas retinianas y coroideas no aparece ninguna otra estructura marcada con el anticuerpo frente a la PGFA.

En las zonas no dañadas directamente pero cercanas a la lesión provocada por el impacto (Figs. 11 y 12), se observa un marcaje perpendicular a la disposición en capas, correspondiente al extremo más interno de las células de Müller, desde la MLI hasta aproximadamente la CPI.

En las secciones del área irradiada de los radios medulares con marcaje inmunohistoquímico (Fig. 13) se aprecia una inmunorreactividad en la CFNO de la zona lesionada mucho mayor que en las zonas no tratadas. Es notable en algunas ocasiones el intenso marcaje en forma de acúmulos en la superficie de contacto con el vítreo.

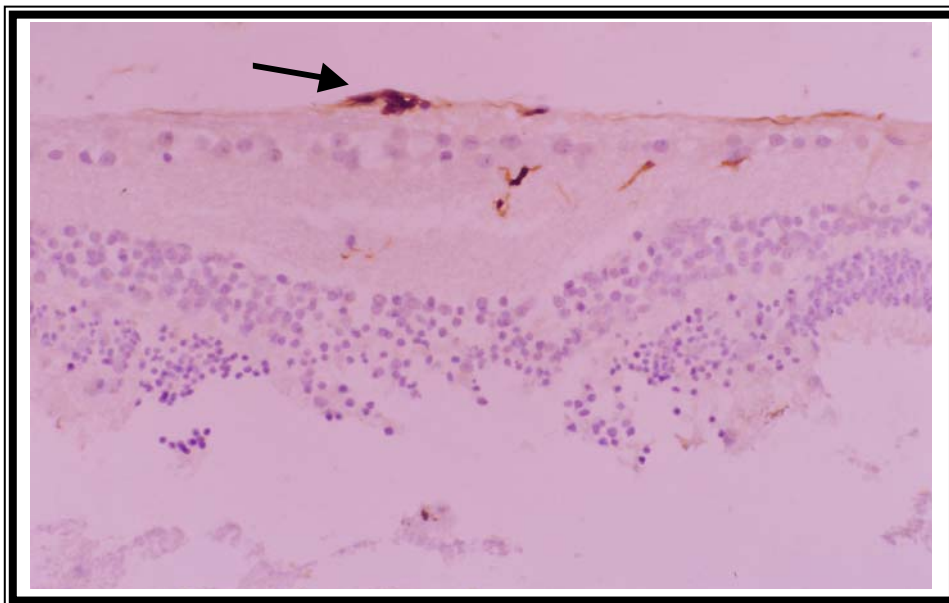


Fig. 8. Lesión 3 días postfotocoagulación. Hipermarcage en la MLI (→). Células P GFA (+) en la C CG y C PI con prolongaciones. Inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina. (250x)

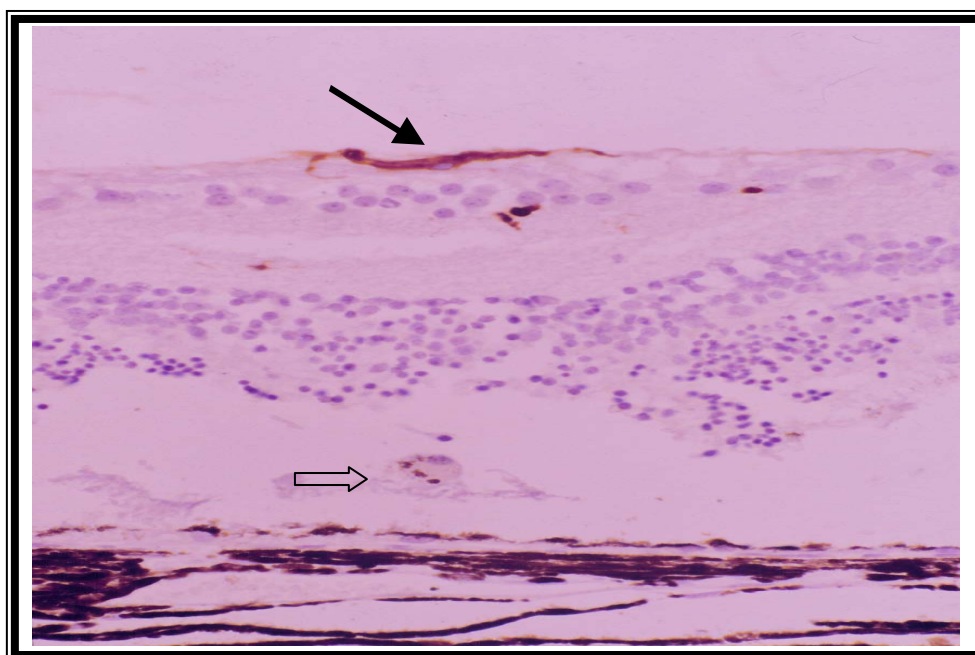


Fig. 9. Lesión retiniana 3 días postfotocoagulación. A cúmulo de fibras PGFA (+) cursando paralelas a las fibras de la CFNO (→). Célula de aspecto globoso con pigmento intracelular (⇨). Inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina (250x)

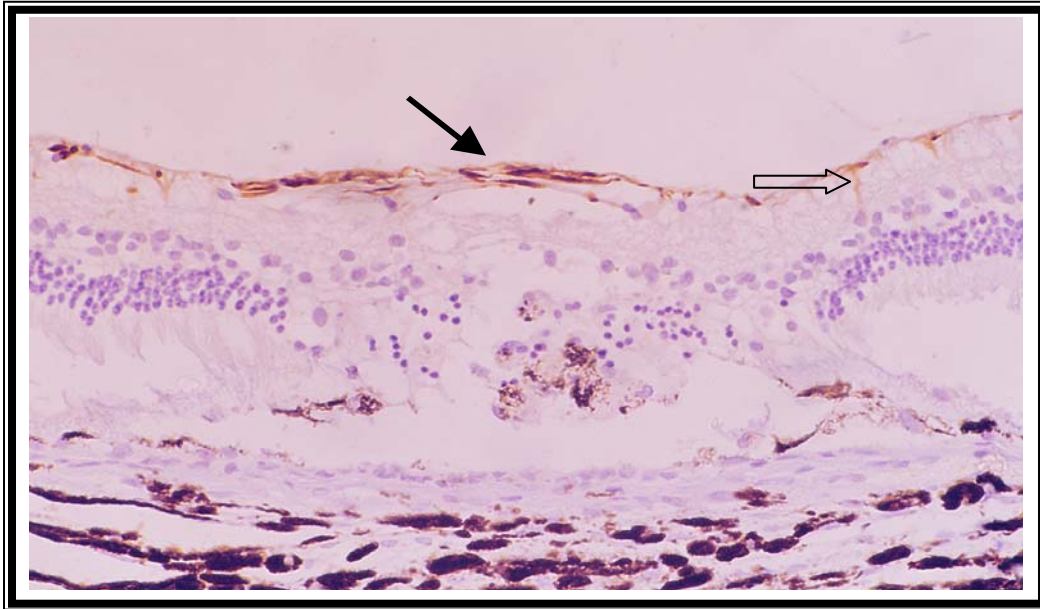


Fig. 10 . L esión r etiniana 3 dí as p ostfotocoagulación. S e ob serva i ntens o m arcaje PGFA (+) en la MLI y CFNO(→). Hay que destacar el marcaje inmunopositivo de las fibras de Müller e n las zonas c ercanas a l i mpacto (⇨). Inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina (250x).

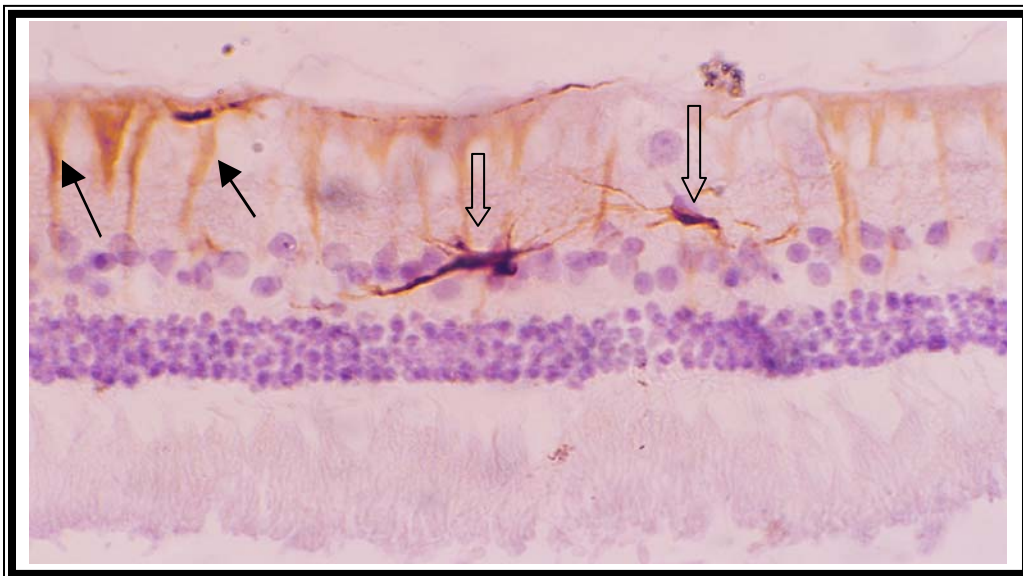


Fig.11: Detalle de zona adyacente a una lesión 3 días postfotocoagulación donde es de destacar el intenso marcaje PGFA (+) de células astrogiales (⇨) y de las fibras más internas de la glía de Müller (→). Inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina (750x)

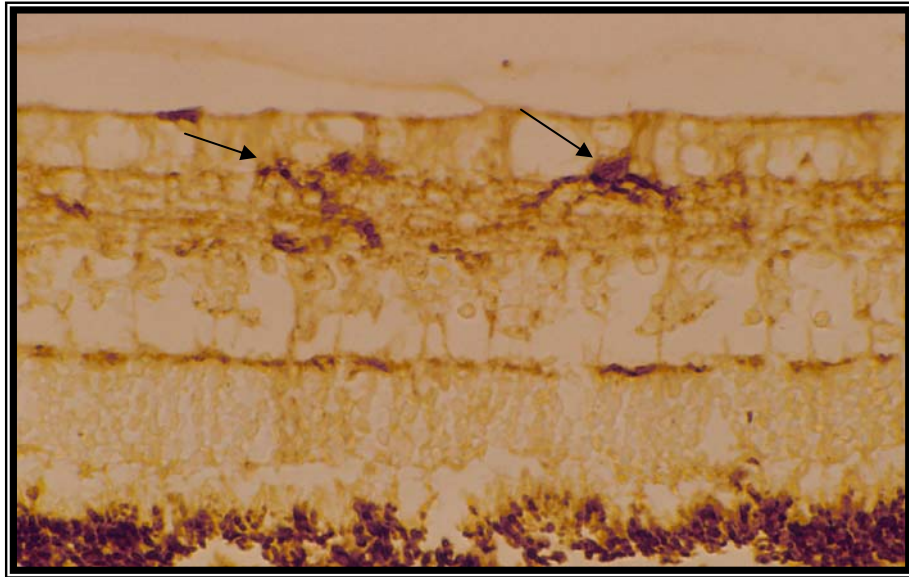


Fig. 12. Zona de la retina sin fotocoagular. Se observan células con el cuerpo celular en la CCG y unas proyecciones hacia la CPI y CNI que presentan una reacción positiva (→) frente a PGFA. Inmunohistoquímica frente a PGFA (750X).

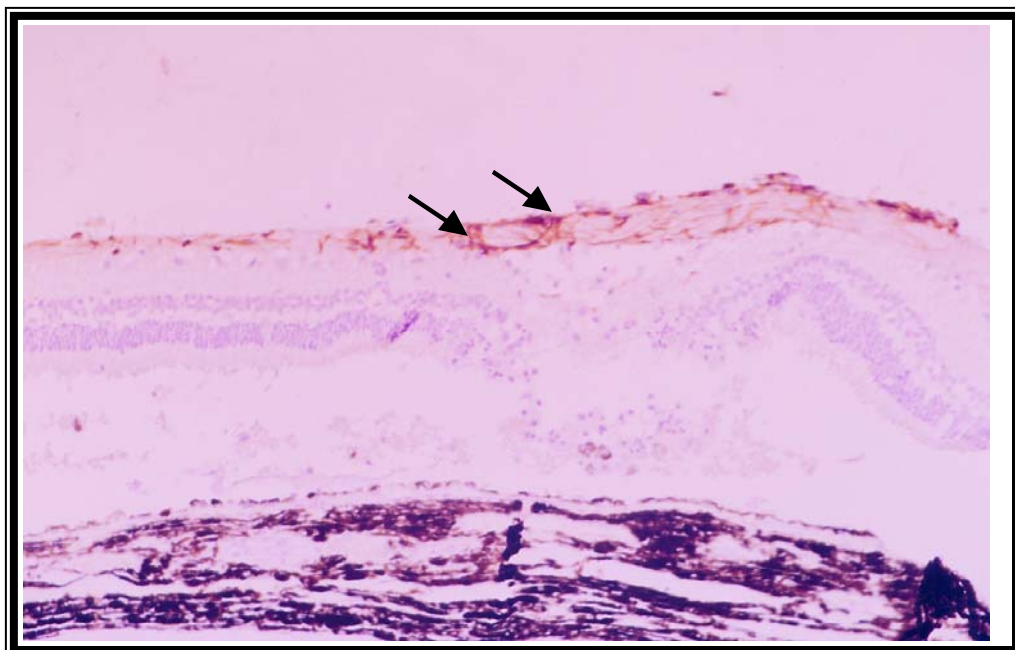


Fig. 13. Lesión en los radios medulares 3 días postfotocoagulación. Se observa un aumento en el inmunomarcaje frente a la PGFA de la zona lesionada (→) en relación con las zonas adyacentes. Inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina (X250)

4.1.2.2. Lectinas (Figs. 14 y 15)

En las preparaciones con inmunomarcaje frente a lectinas se observa marcaje positivo en la MLI y CFNO, así como alrededor de las células ganglionares, alguna de ellas vacuolizada.

En las zonas no afectadas por el impacto se observa un marcaje positivo de células ramificadas e individualizadas en la CPI, mientras que en la zona fotocoagulada el marcaje afecta a todo el área y es difícil individualizar las células marcadas.

La CNI no presenta un aumento notable en la inmunorreactividad, pero es de destacar un marcaje positivo alrededor de algún núcleo de las células de esta capa. Esta inmunopositividad alcanza la CPE.

La CNE tiene una reactividad importante en la zona del impacto, con algunas áreas muy intensamente marcadas, y es muy difícil la descripción de los elementos celulares presentes. Las zonas menos marcadas permiten describir que el marcaje se encuentra alrededor de los cuerpos celulares de donde parten prolongaciones en distintas direcciones, que a veces aparecen discontinuas o intermitentes.

Los segmentos externos de los fotorreceptores presentan mayor inmunorreactividad frente a las lectinas que en las zonas no tratadas. En las secciones que presentan importantes alteraciones retinianas, destaca la presencia de unas células inmunorreactivas de morfología globosa o redondeada con gránulos de pigmento en su interior, situadas en el espacio entre el EPR y las capas retinianas desprendidas. Estas células son de tamaño similar a las del EPR y en alguna ocasión se encuentran adheridas a él.

No se observan diferencias en cuanto al inmunomarcaje con lectinas en las zonas coroideas lesionadas frente a las zonas no tratadas.

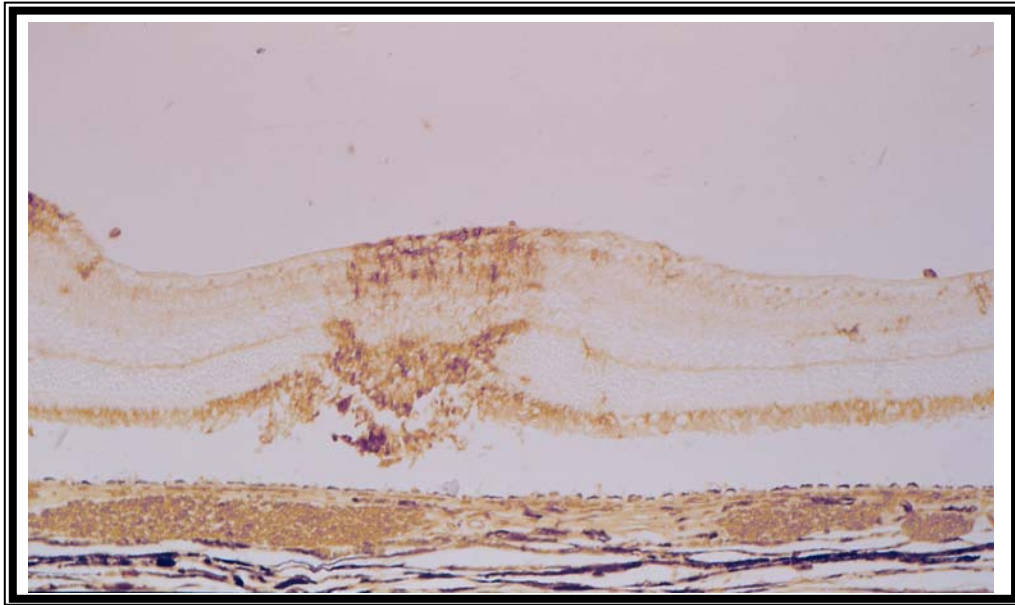


Fig. 14. Lesión retiniana 3 días postfotocoagulación donde se destaca un aumento del marcaje en la zona del impacto mientras que la retina de las zonas no lesionadas permanece sin marcaje. Inmunohistoquímica con lectinas (125X)

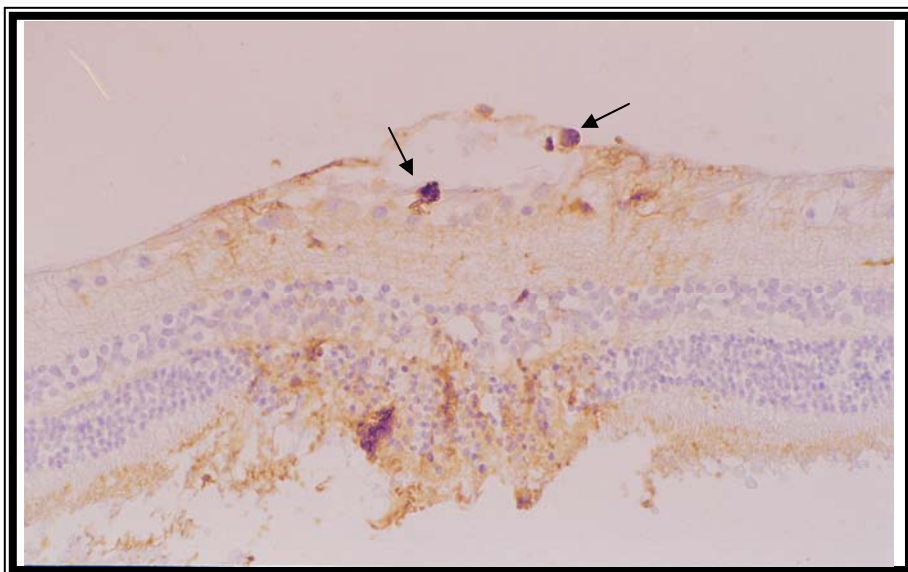


Fig.15. Lesión retiniana 3 días postfotocoagulación. Las flechas muestran el marcaje de elementos celulares de las capas más internas de la retina. Destaca un aumento del marcaje en la CPE y CNE. Inmunohistoquímica con lectinas (250X)

4.2.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 7 DÍAS

En este intervalo de tiempo las diferencias entre la zona central, intermedia y periférica son menores, por lo que la descripción se centrará en las lesiones en la zona central del impacto y en la periferia.

4.2.1.- HEMATOXILINA-EOSINA

4.2.1.1.- Zona central (Fig. 16)

La MLI está ligeramente afectada; la superficie de contacto con el vítreo no es lisa como en las zonas no tratadas, sino que tiene un aspecto ondulado y se aprecia la alteración sufrida por las fibras de las células de Müller que la forman. Las capas internas adyacentes, CFNO y CCG también se encuentran ligeramente afectadas con vacuolización, desorganización y edema celular.

La CPI en general aparece bastante conservada, aunque en las secciones donde las alteraciones de la retina interna son más intensas, la CPI muestra ligero edema.

El área comprendida entre la CNI y el EPR está invadida por un tejido formado por células de aspecto reticular relativamente denso, con grandes espacios intercelulares y vacuolización celular, que morfológicamente presenta un aspecto de "tapón" (Fig. 17). Inmersos en él aparecen elementos celulares nuevos, sin las características propias de las células bipolares o de los fotorreceptores. Sus cuerpos celulares son alargados y con pseudópodos o prolongaciones. Sus núcleos se tiñen con un aspecto parecido al de los núcleos de las células bipolares, pero la morfología es distinta, alargada o en forma de zapatilla. Las células bipolares que permanecen están vacuolizadas. Son pocos los núcleos característicos de los fotorreceptores que se pueden identificar en esta zona. En este tejido destaca la presencia de unas células de aspecto globoso, de gran tamaño, muchas de las cuales presentan pigmento intracelular. En algunas ocasiones se agrupan y se sitúan en el margen más externo del tapón, en la zona más cercana al EPR, o se encuentran fuera de este tejido, dispersas con otros desechos celulares en el espacio entre el EPR y el resto de capas retinianas. Es notable la presencia de pigmento extracelular. Estas células globosas con pigmento no sólo aparecen en este tejido fibroso sino que alcanzan otras capas retinianas más internas, incluso la MLI.

En la mayoría de las secciones, el EPR aparece desprendido del resto de las capas retinianas. En las zonas del EPR que coinciden con la lesión retiniana se observa desde una conservación de las células epiteliales con la MB continua, hasta una hipertrofia notable de estas células con depigmentación y alteración de la MB. En las secciones en las que las capas retinianas han permanecido unidas al EPR, se observa que la MB es discontinua de forma que el tapón fibroso descrito y el tejido coroideo presentan una continuidad.

La coroides aparece también alterada con una intensidad variable, desde un ligero aumento de su grosor producto del edema que se observa, hasta unas alteraciones pigmentarias notables, con pérdida de pigmento sobretodo en el área más cercana al EPR, la CC.

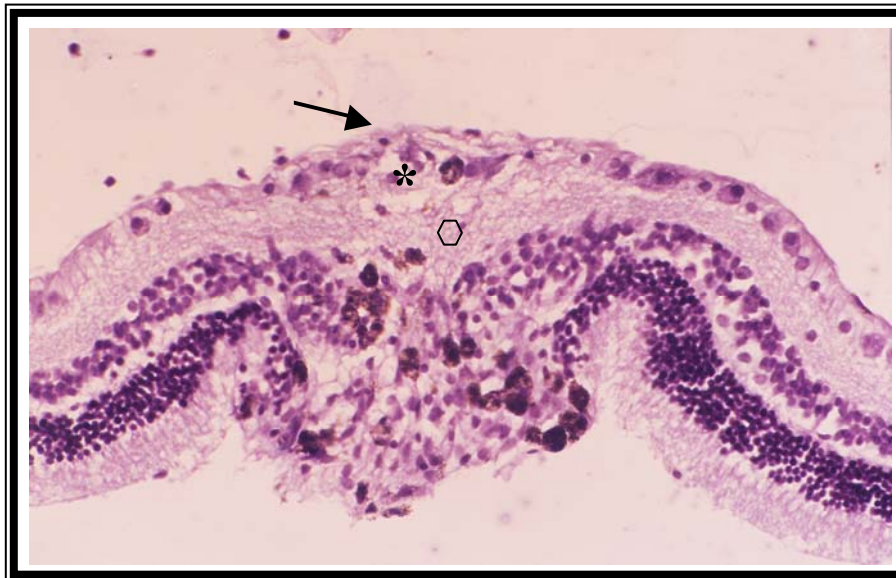


Fig. 16. Lesión retiniana 7 días postfotocoagulación. Alteración de la MLI (→) con ligera afectación en las capas adyacentes, CFNO y CCG, (*) mientras que la CPI se encuentra bastante conservada (◻). Tinción de H-E (500X)



Fig.17. Lesión retiniana 7 días post-fotocoagulación. La zona comprendida entre la CNI y el EPR (círculo) se encuentra invadida por un tejido a modo de “tapón”, donde destacan unas células reticuloides (→) y otras de aspecto globoso y pigmentadas (⇨). Tinción con hematoxilina-eosina (750X)

4.2.1.2.- Zona periférica (Fig. 18)

Las lesiones de la zona periférica tienen características similares a las descritas en la zona central, pero con un notable descenso en la intensidad y extensión de las alteraciones a medida que nos alejamos de la zona central.

En las capas más internas se observa un ligero edema desde la MLI hasta la CPI. La CNV se encuentra parcialmente conservada. El tejido fibroso antes descrito ocupa parcialmente esta CPI e invade totalmente el resto de capas hasta el EPR. En esta zona también aparecen las células cargadas de pigmento que se extienden dentro de las capas retinianas. Se observa pigmento extracelular disperso.

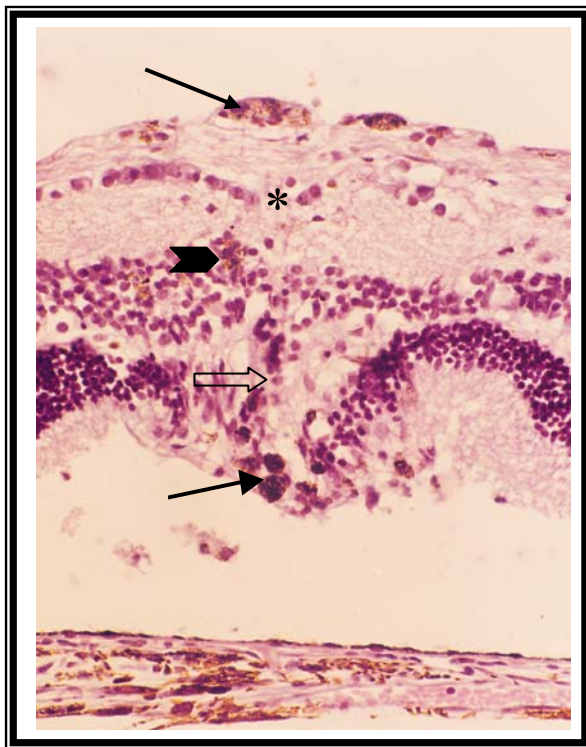


Fig. 18. Zona periférica de la lesión retiniana 7 días postfotocoagulación. Ligero edema de las capas más internas (*). Tejido fibroso ocupando las capas más externas (⇨). Células cargadas de pigmento (→) y pigmento extracelular (➡). Tinción hematoxilina-eosina (500 X)

A continuación, en la Tabla 2 se recogen un resumen de los hallazgos histológicos en cada una de las capas, así como una gradación estimada de cada uno de ellos en la zona central y periférica.

Tabla 2. Resumen hallazgos histopatológicos 7 días post-fotocoagulación con tinción de hematoxilina-eosina

HALLAZGOS Y LOCALIZACIÓN	AREA DE LA LESION		
	CENTRO	PERIFER	IA
MLI			
Ondulada	++		+
Alteración fibras de Müller	++		+
CFNO y CCG			
Edema	++		+
Desestructuración	++		+
Vacuolización celular	++		+
CPI			
Edema	++		+
Desde CNI hasta EPR			
Tejido de aspecto fibroso	++		++
Presencia de células ameboides	++		++
Vacuolización celular	++		+
Muerte celular	++		+
Células globosas con y sin pigmento	++		++
Pigmento extracelular	++		++
EPR			
Hipertrofia celular	++		
Células epiteliales desprendidas	++		
Depigmentación	++		
Células epiteliales conservadas		++	++
MEMBRANA DE BRUCH			
Continua		++	++
Discontinua	++		
COROIDES			
Edema	++		+
Alteraciones pigmentarias	++		+

4.2.1.3.- Radios Medulares (Fig. 19)

En las lesiones provocadas en la zona ocupada por los radios medulares, persisten las alteraciones de las capas retinianas descritas anteriormente.

Destaca la presencia de acúmulos de células cargadas de pigmento en la MLI, formando unas protrusiones hacia el interior del vítreo.

Se ha observado en algunas secciones la separación entre la CFNO engrosada y el resto de las capas retinianas en las áreas de los impactos, mientras que en las zonas sin lesión, la CFNO permanece unida a CPI y al resto de capas retinianas.

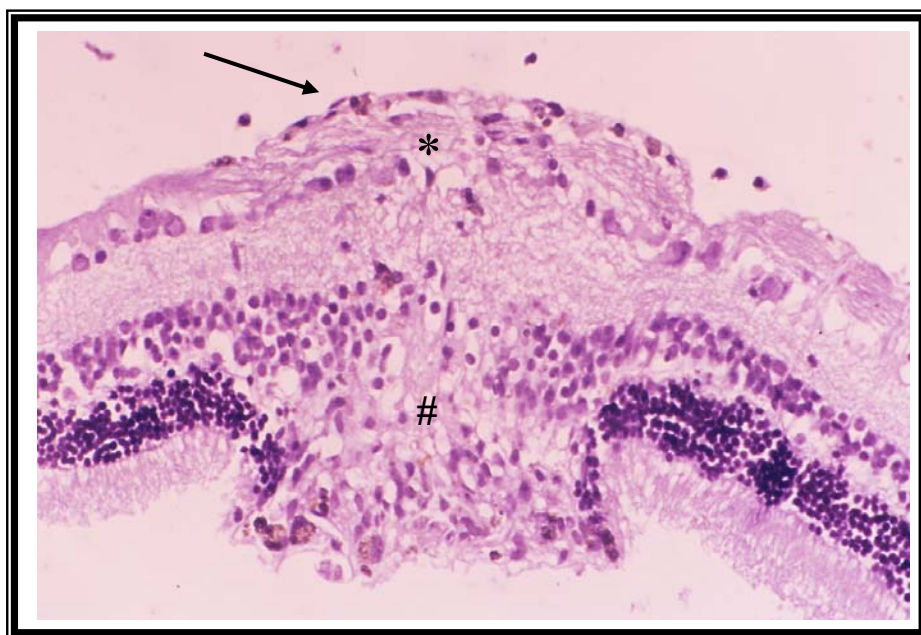


Fig. 19. Lesión 7 días post-fotocoagulación en la zona de los radios medulares. Se observan células con pigmento en la MLI protuyendo hacia el vítreo (→). Edema y desestructuración de fibras en la CFNO (*). Persiste la existencia de un tejido fibroso y células cargadas de pigmento en las capas más externas (#). Tinción hematoxilina-eosina (750X)

4.2.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

4.2.2.1.- PGFA (Fig. 20)

Se observa una inmunopositividad en la zona afectada por la irradiación de las fibras de las células de Müller en la MLI y en su paso a través de la CFNO y CCG. En alguna sección se detecta el marcaje de esta célula a su paso por la CNI.

En la mayoría de las secciones, este inmunomarcaje positivo de las células de Müller en la retina interna coincide con un marcaje en la zona del "tapón", (Fig. 21) localizado en el margen más externo de éste, es decir la zona más cercana al EPR. El marcaje, aunque disperso, permite distinguir en alguna ocasión que la inmunopositividad se encuentra en algunas proyecciones celulares y que forman parte del tejido de aspecto reticuloide.

Las células globosas cargadas de pigmento que se encuentran a distintos niveles en la zona del impacto son PGFA (-).

En los impactos localizados en el área de los radios medulares (Fig. 22), se observa una mayor intensidad en el inmunomarcaje de células que se encuentran en la CFNO. Este marcaje aumentado se extralimita fuera de los márgenes del impacto, afectando a zonas no directamente dañadas pero

cercanas a la lesión. Se observan fibras inmunopositivas paralelas a las fibras nerviosas y otras que las atraviesan perpendicularmente.

Se mantiene también una inmunopositividad en la zona del "tapón" de la retina externa.

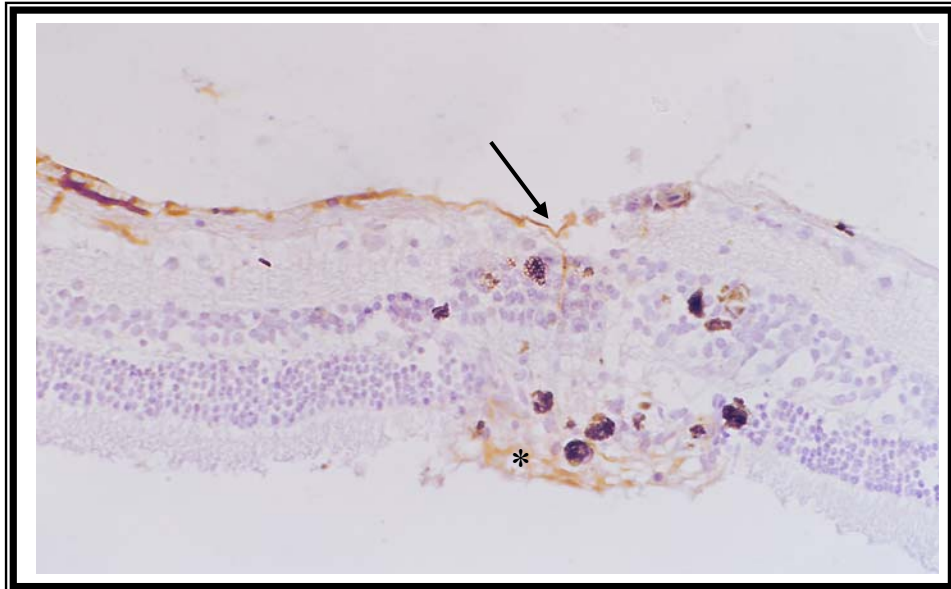


Fig. 20. Lesión retiniana 7 días postfotocoagulación. Se observa reacción inmunopositiva en las fibras de la glía de Müller (→) a su paso por la CFNO, CCG, MPI alcanzando la CNI. También hay una inmunopositividad en el borde más externo del tapón fibroso (*). Destacan las células globosas cargadas de pigmento en todos los niveles retinianos. Tinción inmunohistoquímica con PGFA contrastada con eosina (250X).

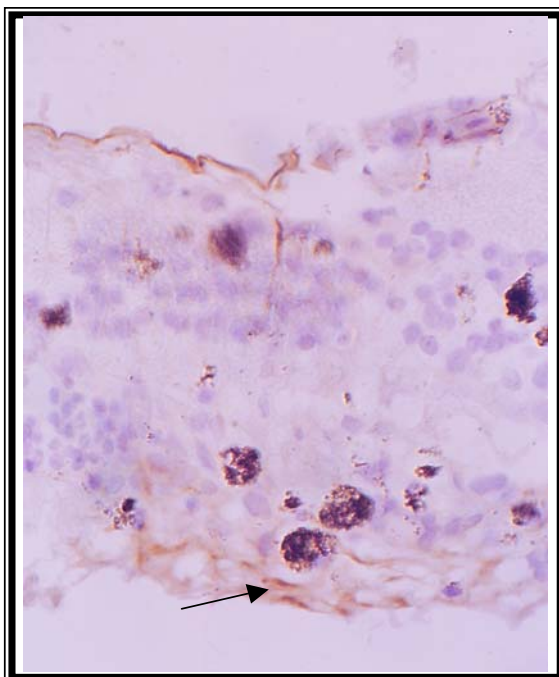


Fig.21. Lesión 7 días postfotocoagulación. Se observa inmunomarcaje PGFA + en la zona del "tapón" de la retina más externa, de tipo reticuloide (→). Tinción inmunohistoquímica con PGFA contrastada con eosina (750X)

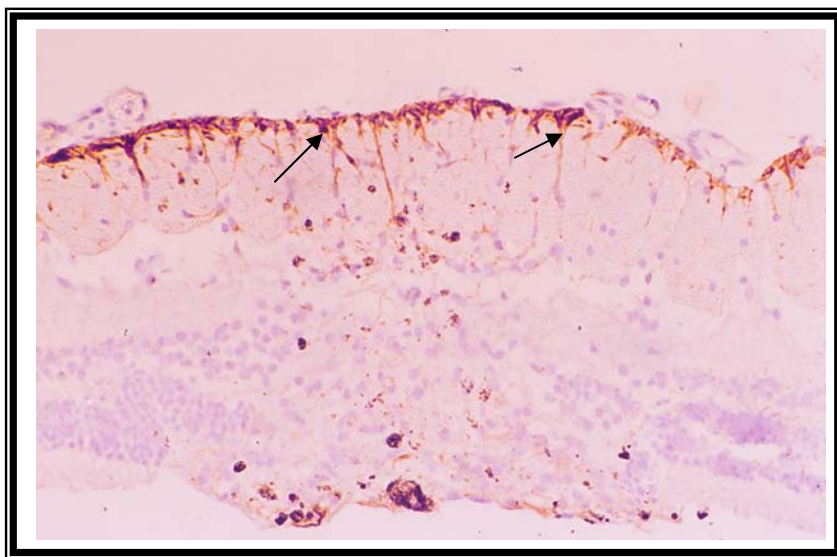


Fig.22. Lesión sobre radios medulares 7 días postfotocoagulación. Mayor intensidad en el inmunomarcaje PGFA + tanto en la zona del impacto como en zona adyacentes no fotocoaguladas (). Tinción inmunohistoquímica con PGFA contrastada con eosina (250X)

4.2.2.2.- Lectinas (Fig. 23)

Es de destacar el inmunomarcaje positivo frente a las lectinas de las células de aspecto globoso cargadas de pigmento que se localizan predominantemente en el límite externo del tapón fibroso pero que aparecen también dispersas en el resto de capas retinianas. Estas células son de morfología irregular con pequeñas prolongaciones que parten de un cuerpo celular cargado de gránulos de pigmentos.

En las zonas no tratadas, (Fig. 24) se individualiza el marcaje de células que se encuentran fundamentalmente en la CPI y que aparecen ramificadas. En la zona de la lesión, estas células son más difíciles de individualizar, el marcaje es más generalizado y las células aparecen con una mayor intensidad del inmunomarcaje y menos ramificadas.

En la zona del "tapón", (Fig. 25) también se observa un inmunomarcaje generalizado y se observan células con un cuerpo celular pequeño y con una serie de prolongaciones que le rodean.

El límite de este tapón en las secciones en que el EPR se encuentra desprendido, se observa un marcaje positivo de la superficie que delimita este tapón fibroso (Fig. 26).

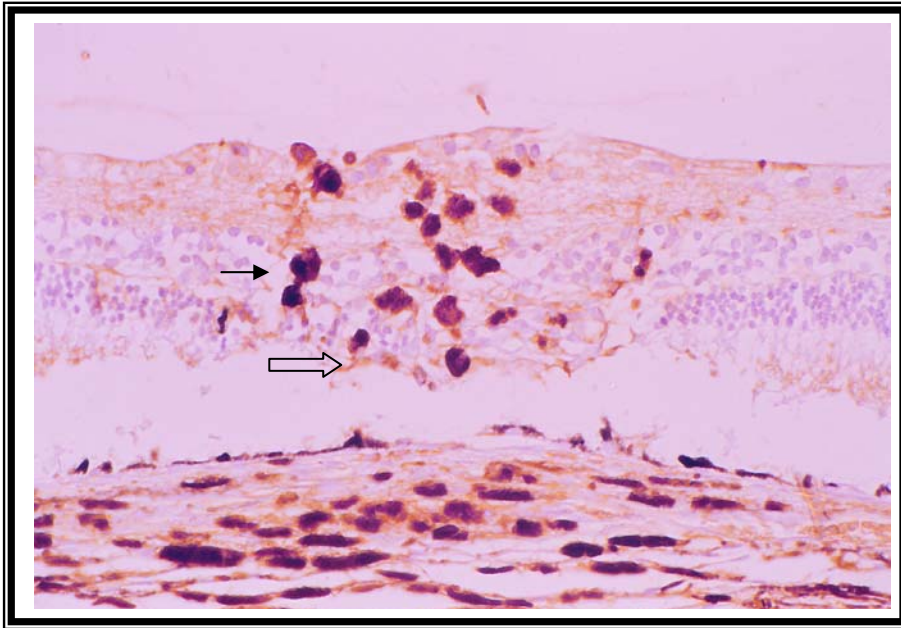


Fig.23. Lesión 7 días postfotocoagulación. Se observa inmunomarcaje positivo frente a las lectinas de células globosas cargadas de pigmento (→). Se observa el marcaje de sus prolongaciones (⇨). Tinción inmunohistoquímica con lectinas contrastada con hematoxilina (400X).

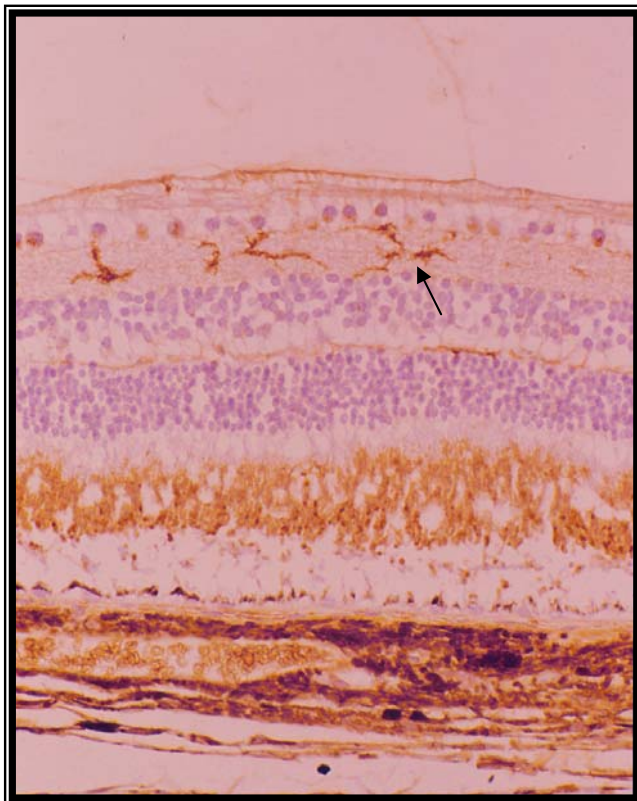


Fig. 24. Retina sin fotocoagular. Se observan células inmunopositivas frente al marcaje con lectinas con el cuerpo celular situado en la CPI del que salen una serie de proyecciones que pueden alcanzar la CNI (→). Inmunohistoquímica con lectinas (500X)

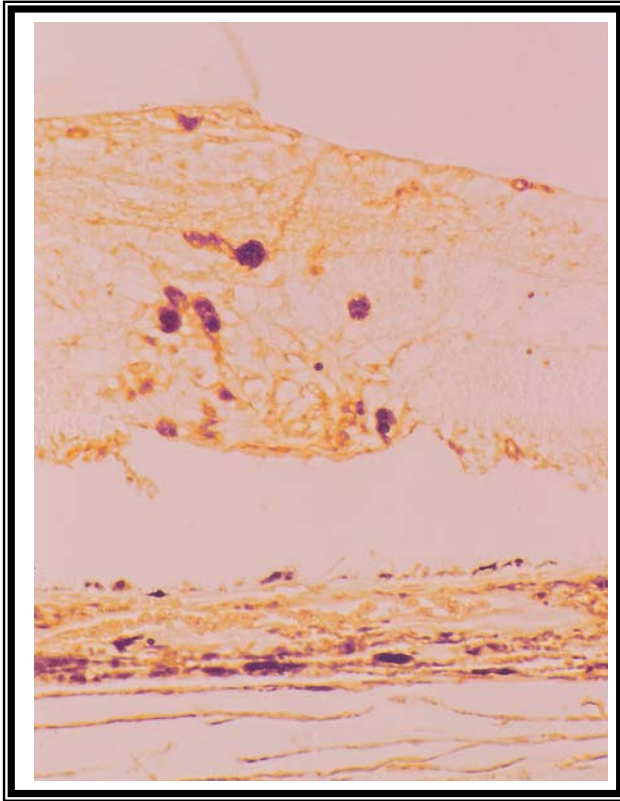


Fig. 25 . Lesión 7 días postfotocoagulación. Se observa un inmunomarcaje positivo con lectinas en la zona del “tapón” en la retina externa. Inmunomarcaje con lectinas (400X).

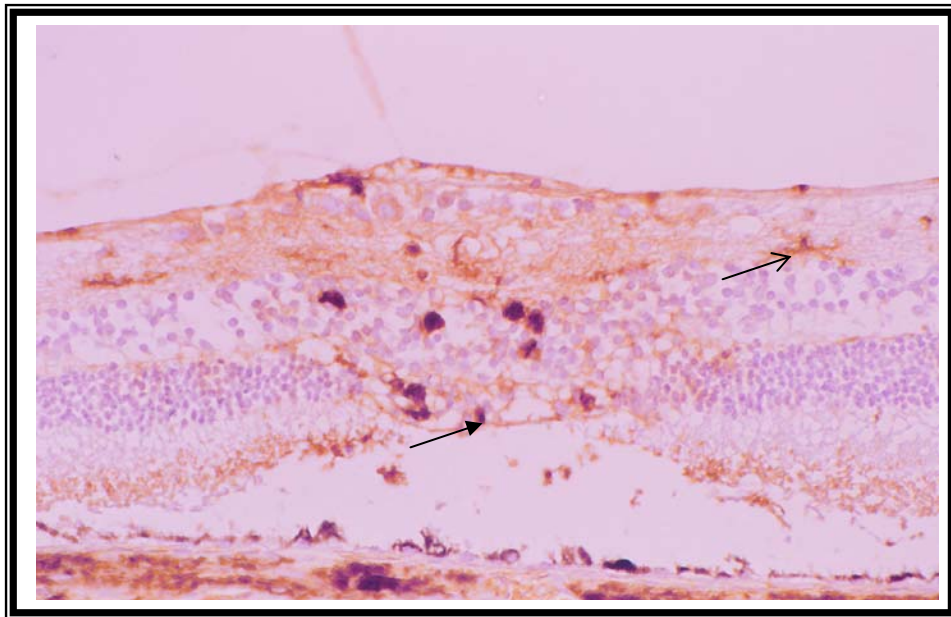


Fig. 26. Lesión 7 días postfotocoagulación. Marcaje inmunopositivo con lectinas en el borde externo del “tapón” (—→). En la zona no tratada se observa el marcaje de células de cuerpo celular pequeño, situadas fundamentalmente en la CPI con marcaje inmunopositivo en sus prolongaciones (—→). Marcaje inmunohistoquímico con lectinas contrastado con hematoxilina (250X)

4.3.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 15 DÍAS

4.3.1.- HEMATOXILINA-EOSINA

4.3.1.1.- Zona central (Fig. 27)

Las alteraciones de las capas retinianas más internas continúan patentes con un aumento destacable en el número de núcleos en la MLI, CFNO y CCG además de grandes espacios vacíos intercelulares y vacuolización celular. Estos núcleos tienen características distintas a los de las células ganglionares, son de tamaño menor y de forma triangular o alargada. En algunos casos, esta acumulación celular provoca la protrusión de la retina hacia el vítreo. La CPI se encuentra edematosa y alterada. En ella, aparecen algunos de estos núcleos descritos previamente y células cargadas de pigmento. Desde la CNI hasta el EPR es patente la presencia de un tejido formado por células de núcleo alargado o triangular, que no se parecen ni a los de las células bipolares ni a los de los fotorreceptores. Estas células emiten unas prolongaciones y dejan espacios entre ellas formando una estructura a modo de malla. En algunas secciones aparecen áreas con menor laxitud y mayor densidad disminuyendo los espacios intercelulares. En esta estructura destaca la presencia de células globosas de mayor tamaño que las descritas a los 7 días, pero en menor número. Estas células se localizan también en las capas internas, llegando a observarlas en la CCG. En algunas de las secciones, este tejido aparece en continuidad con el tejido coroideo, no pudiéndose diferenciar ni las células del EPR ni la membrana de Bruch.

En la coroides, además del edema generalizado se observan notables alteraciones pigmentarias. En la CC, en cambio, no hay células pigmentadas. En las zonas más externas de la coroides, la disminución del pigmento es patente y el que permanece forma acúmulos perdiendo la distribución homogénea de las zonas no tratadas.

4.3.1.2.- Zona periférica (Fig. 28)

Cuanto más nos alejamos del centro del impacto, las alteraciones disminuyen en su intensidad y extensión. La MLI, CFNO, CCG y CPI únicamente presentan un ligero edema. La CNI además de edematosa aparece parcialmente invadida por el tejido descrito anteriormente y que ocupa la región desde esta capa hasta el EPR.

En algunas secciones donde la retina afectada aparece desprendida del EPR, este tejido forma un "tapón" perfectamente delimitado, con células globosas y pigmentadas. En estos casos, el EPR cercano aparece muy conservado así como la MB.

Las alteraciones pigmentarias de la coroides persisten. Es notable la depigmentación de las capas más superficiales y acúmulos de las zonas más externas.

En la Tabla 3 se recogen un resumen de los hallazgos histológicos en cada una de las capas, así como una gradación estimada de cada uno de ellos en la zona central y periférica.

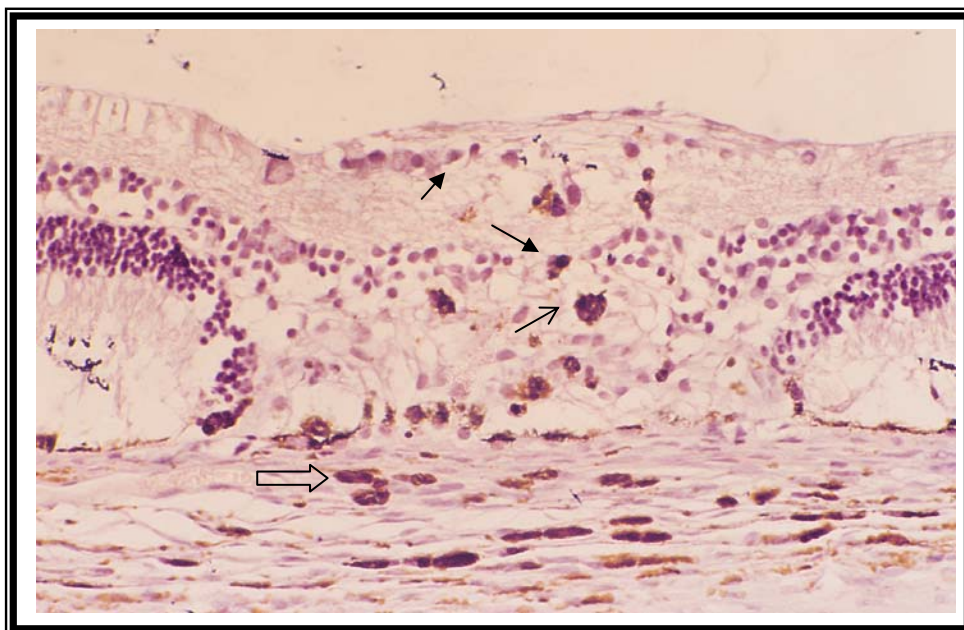


Fig. 27. Zona central de la lesión 15 días post fotocoagulación. En la zona más interna, además de la desestructuración, destaca la presencia de núcleos de aspecto triangular, en algunos casos cargados de pigmento (→). En la retina externa, sobre un tejido “malla” aparecen células de aspecto glóboso y gran tamaño, frecuentemente cargadas de pigmento (→). En la coroides es notable la presencia de acúmulos pigmentarios (→). Tinción hematoxilina-eosina (250X).

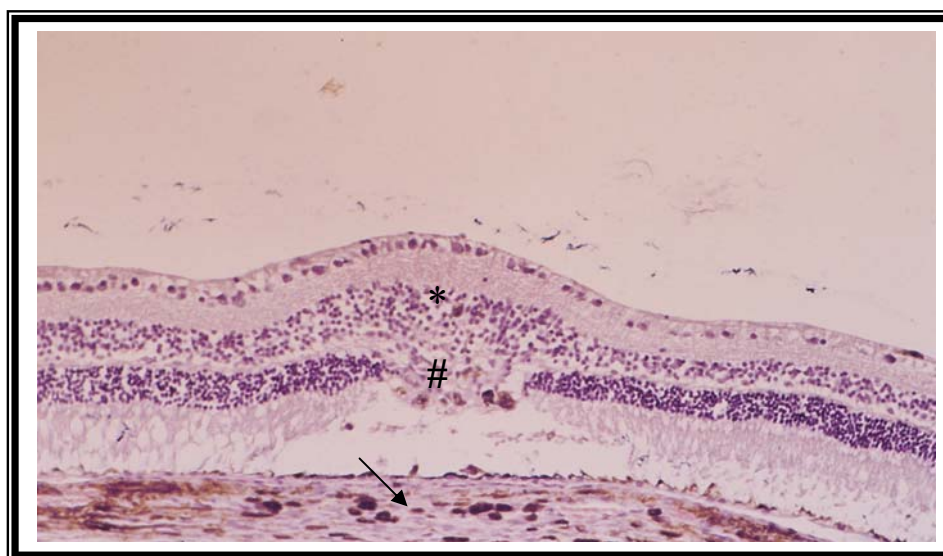


Fig. 28. Zona periférica de lesión 15 días postfotocoagulación. Se observa un ligero edema de la retina más interna hasta la CNI (*). Tejido de tapón en la retina más externa (#) y alteraciones pigmentarias en la coroides (→). Tinción hematoxilina-eosina (125X).

Tabla 3. Resumen hallazgos histopatológicos 15 días post-fotocoagulación con tinción de hematoxilina-eosina

HALLAZGOS Y LOCALIZACIÓN	AREA DE LA LESION		
	CENTRO	PERIFER	IA
MLI			
Ondulada	+		-
Alteración fibras de Müller	+		-
CFNO			
Edema	++		+
Desestructuración	++		+
	++		+
CCG			
Vacuolización celular	++		+
Presencia de cél. no ganglionares	++		-
CPI			
Edema	++		+
Alteración estructural	++		+
Presencia de cél. no ganglionares	++		-
Presencia cél. pigmentadas	++		-
Desde CNI hasta EPR			
Tejido de aspecto fibroso	++		+
Presencia de células ameboides	++		+
Células globosas con y sin pigmento	++		+
Pigmento extracelular	++		+
EPR			
Hipertrofia celular	++	-	+
Células epiteliales desprendidas	++	-	+
Depigmentación	++	-	+
Células epiteliales conservadas	-	+	-
MEMBRANA DE BRUCH			
Continua		+	-
Discontinua	++	-	+
COROIDES			
Edema	++		+
Alteraciones pigmentarias	++		++

4.3.1.3.- Radios Medulares (Fig. 29)

Los impactos en la zona de los radios medulares muestran hipertinción de la CFNO y aumento del número de células presentes en esta zona. Este aumento en el número de células provoca un crecimiento de esta estructura hacia el vítreo.

Destaca el desprendimiento de las fibras mielinizadas de la CFNO del resto de las capas retinianas, que mantienen las mismas alteraciones descritas anteriormente.

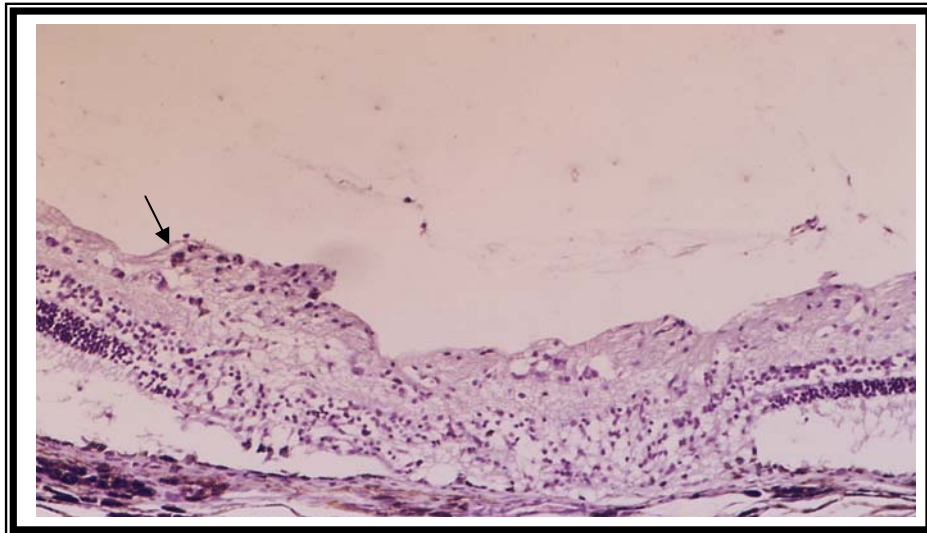


Fig. 29. Lesión 15 días postfotocoagulación en la zona de los radios medulares. Es notable la invasión en el vítreo de protuberancias provocadas por un engrosamiento o proliferación de las fibras que forman la CFNO (→). Tinción hematoxilina-eosina (125X).

4.3.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

4.3.2.1.- PGFA (Fig. 30)

Aparecen con marcaje inmunopositivo algunas células situadas en el tapón de tejido reticuloide situado en las capas retinianas más externas. Las células marcadas presentan un núcleo elipsoide o triangular alargado y el marcaje positivo se observa en sus prolongaciones.

En la retina interna, también se observa un marcaje de las terminaciones de las células de Müller en la MLI y en su paso cruzando la CFNO y CCG.

En la zona de los radios medulares, (Fig. 31) el marcaje de la CFNO es mayor y más intenso en las áreas del impacto que en las zonas no lesionadas. El marcaje es así mismo más intenso en la MLI y en los vasos sanguíneos epirretinianos así como en las distintas células situadas entre los axones mielinizados. Las fibras que unen esta CFNO engrosada con el resto de capas retinianas también están marcadas.

4.3.2.2.- Lectinas (Fig. 32 y 33)

En términos generales la zona del impacto presenta una inmunorreactividad positiva más intensa frente a lectinas que las zonas no tratadas.

En el área del impacto hay mayor intensidad en el inmunomarcaje entre la MLI y CPI. En esta zona se observa el marcaje de cuerpos celulares y fibras, así como de las células globosas en la MLI, CFNO y CCG.

El tejido descrito que ocupa el área entre la CNI y el EPR no presenta mayor intensidad en el inmunomarcaje de forma generalizada, sino que se aprecian sólo algunas células inmunopositivas. En el borde de este tapón fibroso más cercano al EPR, aparecen marcadas unas células con cuerpo celular pequeño del que emiten prolongaciones ondulantes que también se ramifican. De igual forma, son positivas las células grandes y redondeadas que contienen pigmento en su interior.

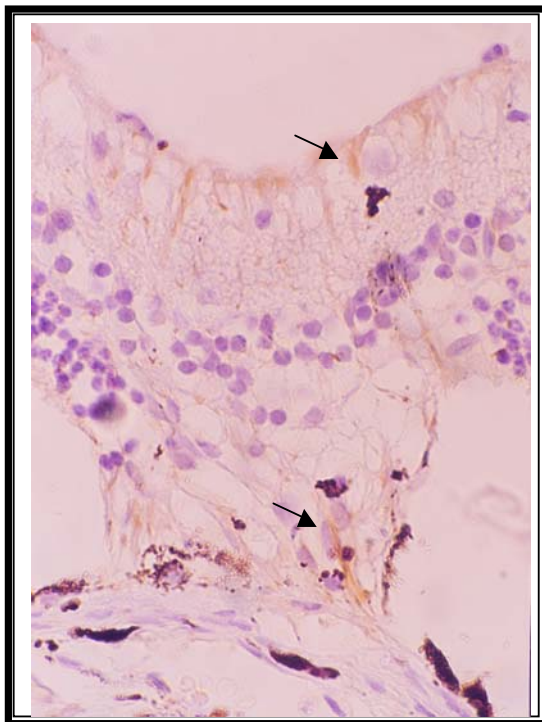


Fig.30. Lesión 15 días postfotocoagulación. Marcaje PGFA inmunopositivo tanto en las prolongaciones de algunas células que forman el "tapón" así como en las terminaciones de la glía de Müller, fundamentalmente en la MLI (—>). Técnica inmunohistoquímica con PGFA. (500X)

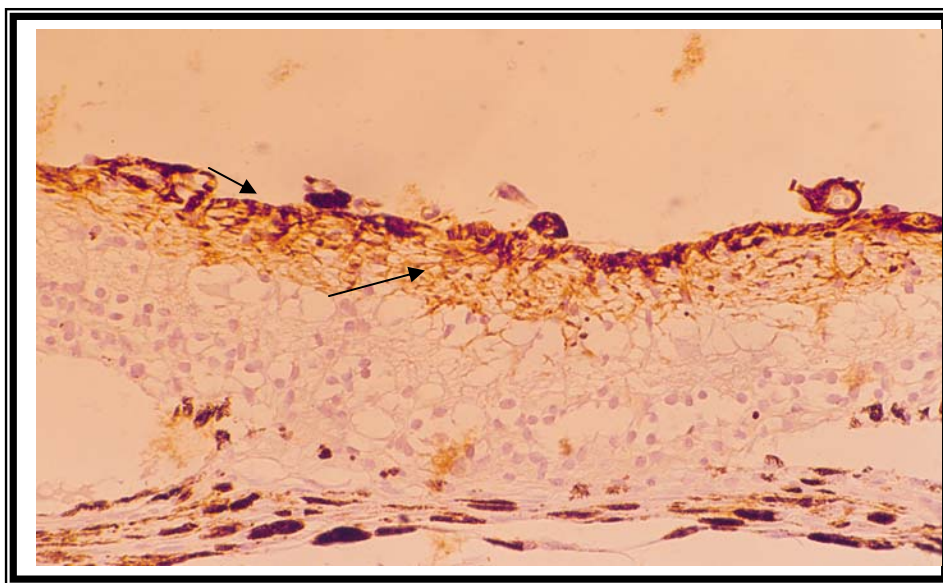


Fig. 31. Lesión 15 días postfotocoagulación en la zona de los radios medulares. Intenso marcaje PGFA (+) en la retina más interna y vasos sanguíneos epi-retinianos (—>). Inmunotinción con PGFA. (250X)

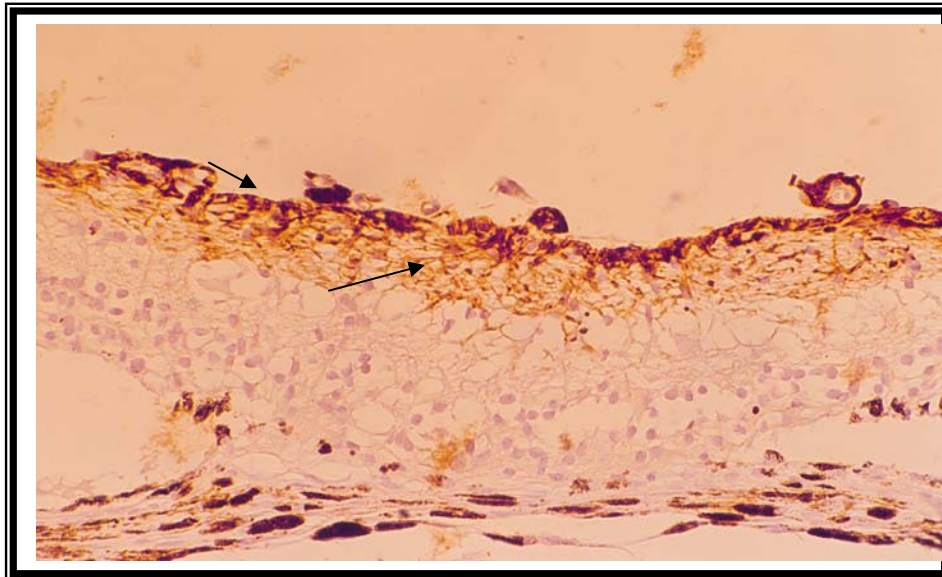


Fig. 31. Lesión 15 días postfotocoagulación en la zona de los radios medulares. Intenso marcaje PGFA (+) en la retina más interna y vasos sanguíneos epirretinianos (—→). Inmunotinción con PGFA. (250X)

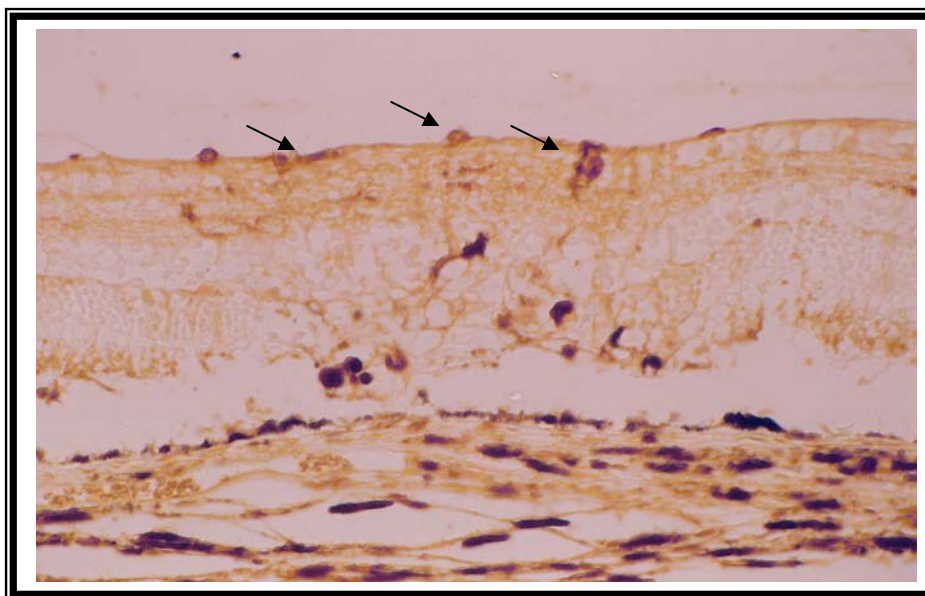


Fig.32. Lesión 15 días postfotocoagulación. Marcaje lectina (+) de cuerpos celulares y fibras en la retina más interna (—→). Inmunotinción con lectinas (250X).

4.4.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 1 MES

4.4.1.- HEMATOXILINA-EOSINA

4.4.1.1.- Zona central (Fig. 34)

La MLI está alterada así como la CFNO adyacente donde se observan espacios entre las fibras nerviosas que la ocupan en la zona del impacto. En la CCG se observa vacuolización celular y un ligero aumento en el número de núcleos que la ocupan y que presentan una morfología diferente a los de las células ganglionares. En unos casos, su tamaño es menor que el de las células ganglionares que se observan en las zonas no tratadas y en otros casos el tamaño es mayor presentando además en su interior acúmulos de cromatina.

Las alteraciones de la CPI varían entre el edema y la intensa desestructuración.

Desde la CNI hasta el EPR se observa una zona invadida por un tejido de aspecto reticuloide. Este tejido puede aparecer más laxo con grandes espacios intercelulares, núcleos picnóticos y presencia de desechos celulares y pigmento disperso o puede aparecer más denso, en las cercanías del EPR, con menores espacios vacíos y con la presencia de distintas células. Unas presentan un núcleo pequeño con morfología de triángulo irregular y otras células cuyo núcleo es alargado. Éstas últimas aparecen en el tejido coroideo, sobretodo en la coriocapilar, formando una solución de continuidad entre ambos.

En esta zona también aparecen una células de mayor tamaño, de aspecto globoso cargadas de pigmento que a veces forman acúmulos en este nivel y en otras ocasiones se encuentran de forma aislada en zonas más internas de la retina, como puede ser la CPI o la CFNO. En estos niveles en ocasiones también se observa la presencia de pigmento extracelular.

El EPR aparece alterado, con las células epiteliales hipertróficas depigmentadas o bien con acúmulos de pigmento densos, la membrana basal y membrana de Bruch discontinua (Fig. 35).

La coroides aparece edematosa en su totalidad. En la CC aparece un aumento de células con similares características a las observadas en el tejido antes referido que ocupa la retina externa. Estas células presentan el núcleo con morfología alargada normalmente dispuesto paralelo al EPR. Esta capa más cercana a la retina presenta los vasos sanguíneos ocluidos y una notable disminución en el pigmento en comparación con las zonas no lesionadas.

En las capas más externas de la coroides y sobretodo en la supracoroides, el efecto más destacable es la desorganización pigmentaria. Mientras en las zonas no tratadas aparece distribuido de forma

homogénea e uniforme, en la zona del impacto el pigmento se encuentra formando unos acúmulos de morfología elíptica con su diámetro mas largo dispuesto paralelo al EPR.

4.4.1.2.- Zona periférica (Fig. 35)

En la zona que rodea al centro y a medida que nos alejamos de él disminuye la intensidad de las alteraciones descritas para la zona central.

Es de destacar el persistente aumento del número de núcleos que ocupan las capas más internas de la retina, MLI, CFNO y CCG, que ya ha sido destacado en la descripción de la zona central.

También destaca la reorganización de las capas más externas en las que, a pesar de la gran desestructuración y edema, se puede diferenciar la disposición de los núcleos separados por la CPE, mientras que la zona central aparece invadida por un tejido de aspecto reticular.

A continuación, en la Tabla 4 se recogen los hallazgos histológicos en cada una de las capas.

Tabla 4. Resumen hallazgos histopatológicos 1 mes post-fotocoagulación con tinción de hematoxilina-eosina

HALLAZGOS Y LOCALIZACIÓN	AREA DE LA LESION	
	CENTRO PERIFER	IA
De MLI a CCG		
Ondulada	+	-
Alteración fibras de Müller	+	-
Edema	++	+
Desestructuración	++	+
Presencia de cél. no ganglionares	++	++
Vacuolización celular	++	++
CPI		
Edema	++	+
Alteración estructural	++	+
Desde CNI hasta EPR		
Tejido de aspecto fibroso	++	-
Presencia de cél. con núcleo pequeño y triangular	++	+
Presencia con cél. de núcleo alargado	++	+
Muerte celular	++	-
Células globosas con y sin pigmento	++	-
Pigmento extracelular	++	+
Recuperación citoarquitectura	-	+
EPR		
Hipertrofia celular	++	+
Células epiteliales desprendidas	++	+
Depigmentación	++	+
Células epiteliales conservadas	-	-
MEMBRANA DE BRUCH		
Continua		+
Discontinua	++	-
COROIDES		
Edema	++	+
Oclusiones vasculares	++	+
Presencia con cél. de núcleo alargado	++	-
Alteraciones pigmentarias	++	+

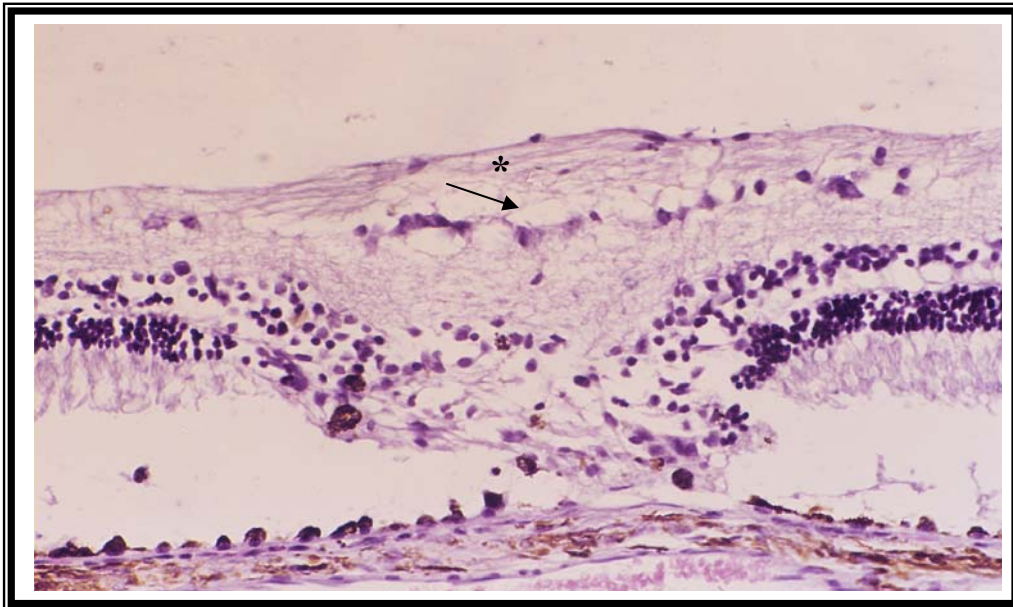


Fig. 34. Zona central de la lesión 1 mes postfotocoagulación. Notable desestructuración de las capas retinianas más internas (*). Es notable la vacuolización de las células ganglionares (→). Tinción H-E (250X).

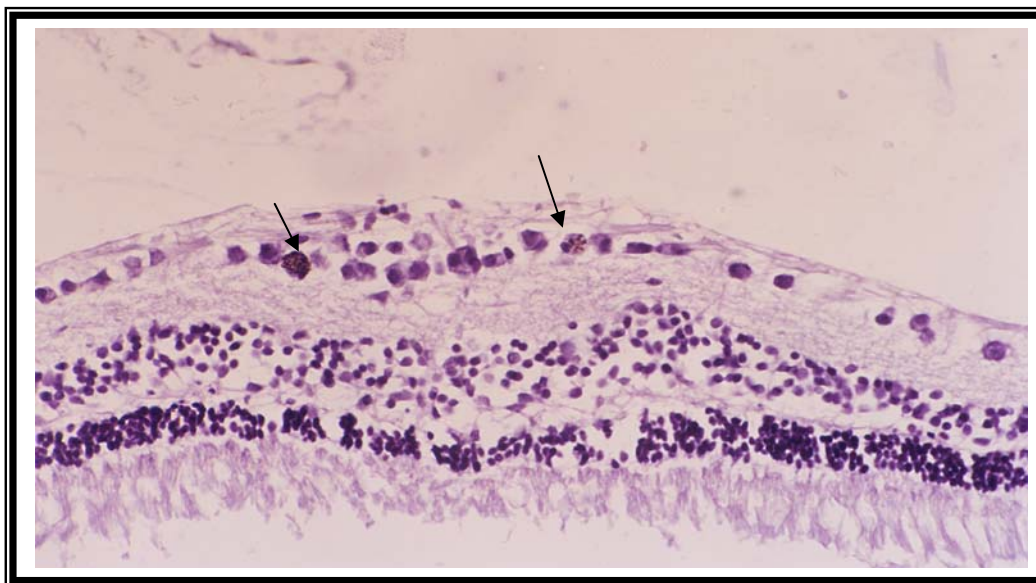


Fig.35. Zona periférica de la lesión tras 1 mes postfotocoagulación. Núcleos hipertrofiados de las células ganglionares con acúmulos de cromatina en su interior (→). Recuperación de la citoarquitectura retiniana. Tinción H-E (250X).

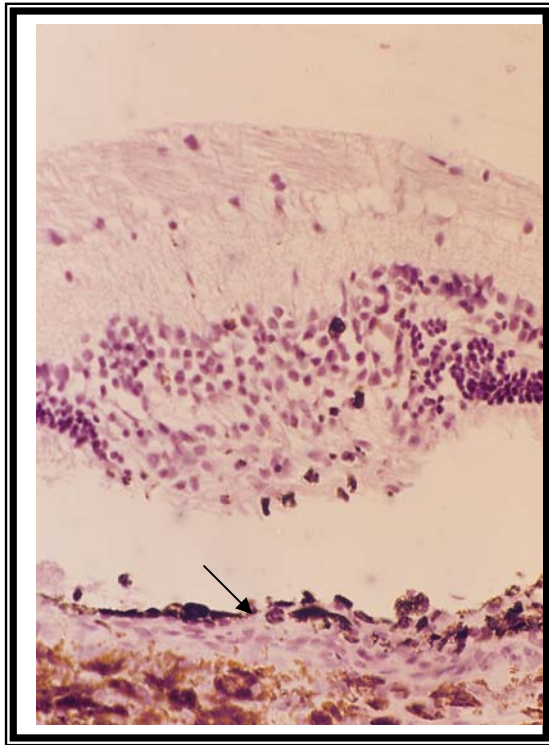


Fig. 36. Lesión 1 mes postfotocoagulación en el área de los radios medulares. La retina externa se encuentra invadida por un tejido de aspecto reticuloide en el que aparecen diversas morfologías celulares (*). Células del EPR hipertrófica y discontinuidad de la membrana de Bruch (→). Tinción hematoxilina-eosina (250X).

4.4.1.3.- Radios Medulares (Fig. 36)

Hay que destacar que la CFNO donde se sitúan las fibras nerviosas mielinizadas aparece más separada del resto de capas retinianas en las zonas del impacto y que las fibras de la glía de Müller que las unen presentan un aspecto más deshilachado.

Las células grandes de aspecto globoso cargadas de pigmento anteriormente descritas también se observan en el interior de esta CFNO, entre los fascículos de axones mielinizados.

4.4.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

4.4.2.1.- PGFA (Fig. 37)

Aparece marcaje inmunopositivo en las terminaciones de las células de Müller en la MLI y en su recorrido perpendicular cruzando la CFNO y CCG. En algunas secciones, también aparecen marcadas estas células en su trayecto por la CPI.

Otra zona con inmunomarcaje positivo es el tejido que ocupa la retina externa. El marcaje aparece en el área más externa y cercana al EPR, donde se localizan en muchas ocasiones los acúmulos de células globosas pigmentadas anteriormente señaladas. Estas células granulosas y cargadas de pigmento no muestran marcaje frente a la PGFA.

En la región de los radios medulares (Fig. 38) con impactos, la intensidad del inmunomarcaje es mayor en la MLI, que presenta acúmulos inmunopositivos, en la gruesa CFNO y en las fibras de las células de la Müller que la cruzan y que atraviesan toda la retina.

Asímismo el marcaje del resto de las capas retinianas de esta área se limita al margen del tejido fibroso que ocupa las capas retinianas más externas.

4.4.2.2.-Lectinas (Fig. 39 y 40)

Destacan las células globosas cargadas de pigmento en gránulos con marcaje positivo para las lectinas. El marcaje se encuentra tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones cortas y tortuosas que salen de él. Estas células se encuentran en toda la capa retiniana situándose incluso sobre la MLI y cuyas prolongaciones penetran en el tejido retiniano.

La CPI presenta una mayor inmunopositividad en las zonas del impacto en comparación con las zonas no tratadas. En esta capa no es fácil individualizar el marcaje de las células exceptuando las grandes y globosas descritas en el párrafo anterior, mientras que en la CPI de las zonas no tratadas se encuentran unas células con cuerpo celular pequeño y prolongaciones largas y tortuosas en todas las direcciones, con una distribución uniforme y homogénea.

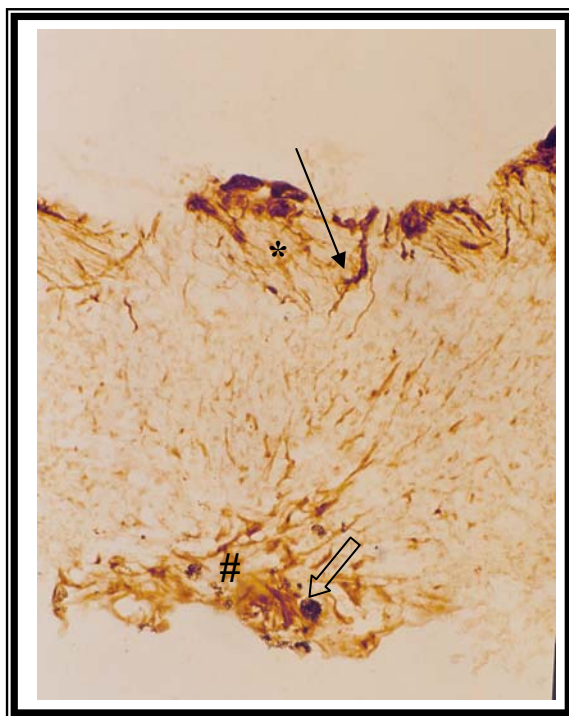


Fig. 37. Lesión 1 mes postfotocoagulación en la zona de los radios medulares. Marcaje inmunopositivo en la MLI, CF NO y CCG (*), así como en las terminaciones más internas de la glía de Müller (—→). Destaca inmunorreacción positiva en la retina externa (#), donde aparecen células pigmentadas sin marcaje (⇨). Inmunohistoquímica frente a PGFA (500X).

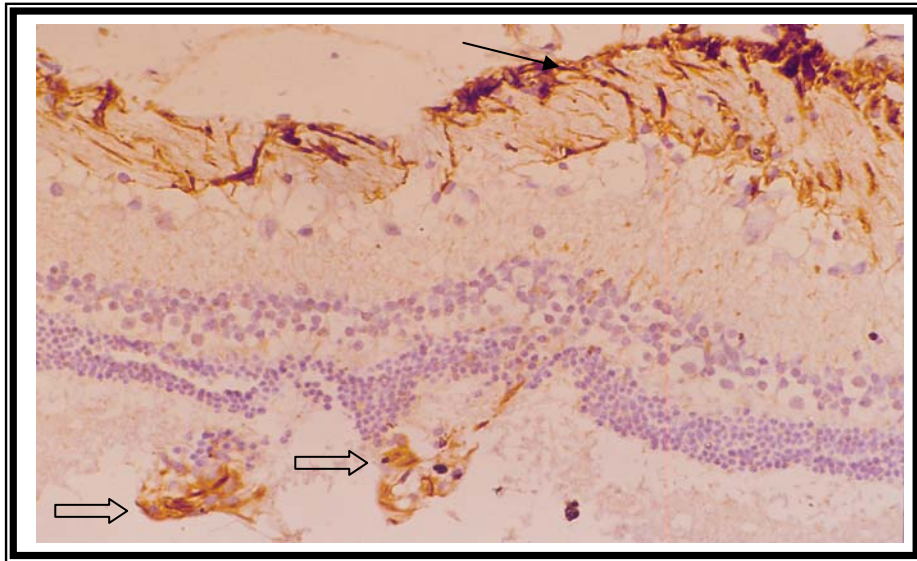


Fig. 38. Lesión 1 mes post fotocoagulación en el área de los radios medulares. Inmunopositividad de la glía de Müller (→) y el borde más externo de la lesión en la retina externa (⇨). Inmunohistoquímica frente a PGFA (250X).

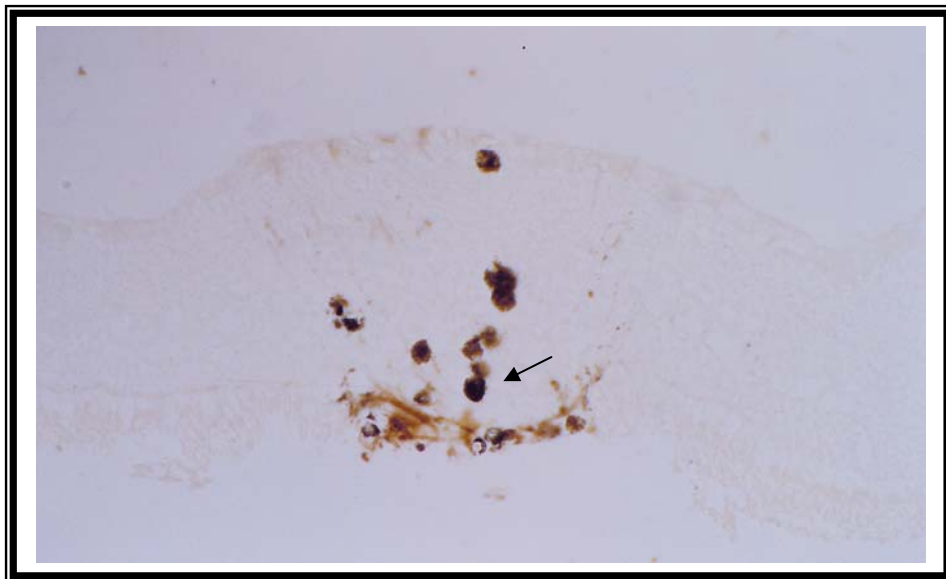


Fig. 39. Lesión 1 mes postfotocoagulación. Células inmunopositivas cargadas de pigmento (→). Inmunohistoquímica con lectinas. (750X).

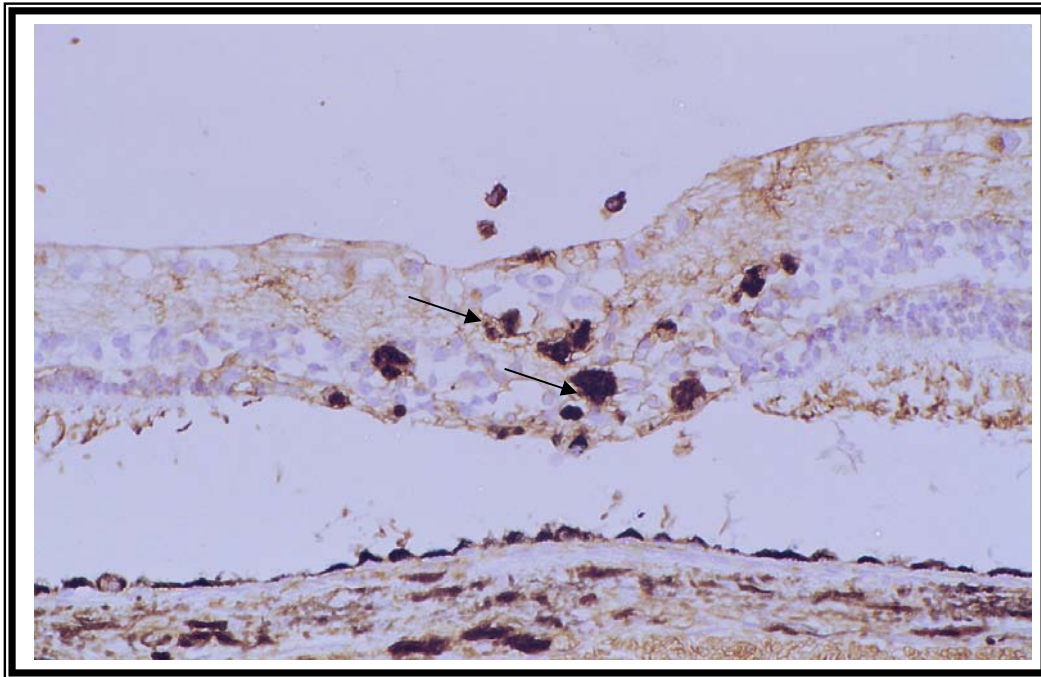


Fig. 40. Lesión 1 mes postfotocoagulación. Células cargadas de pigmento e inmunopositivas que aparecen en toda la retina (——→). Inmunohistoquímica con lectinas contrastada con hematoxilina (250X).

4.5.- TIEMPO POST-FOTOCOAGULACIÓN: 2 MESES

4.5.1.- HEMATOXILINA-EOSINA

4.5.1.2.- Zona central (Fig. 41)

Las capas más internas de la retina compuestas por la MLI, CFNO y CCG presentan diversos grados de alteración que varían desde el edema hasta una intensa desestructuración celular y un considerable aumento del número de células.

La CPI está conservada, pero en algunas ocasiones se encuentra invadida por células que provienen de la CCG o por células grandes cargadas de pigmento. Desde esta zona hacia el exterior se suele encontrar una CNI engrosada por el edema y por la presencia de núcleos con características distintas a los de las células bipolares.

Desde la CPE hasta el EPR se observa la presencia de un tejido a veces reticular laxo y otras más denso, que taponan esta zona. En algunas ocasiones se observa que la MB está rota de forma que sus células forman un tejido continuo con las del EPR y CC. La mayoría de estas células presentan un núcleo elipsoidal alargado y en muchas secciones ocupan el área de la CNE y segmentos externos de los fotorreceptores formando un tejido más denso, aunque en otros casos se encuentran en la CNI. En esta zona, se observan unas células de cuerpo y núcleo grandes y redondeados que acumulan cantidades variables de pigmento y se encuentran bien agrupadas en el margen más externo formando una barrera con el EPR o bien en las capas más internas de la retina. En este caso suelen estar más individualizadas en diferentes niveles de las capas retinianas.

El aspecto general de la coroides es edematoso. Como se ha comentado anteriormente, es notable el aumento del número de células en la CC, algunas de ellas atravesando la MB y adentrándose en las capas retinianas más externas. El resto de las capas coroides también presentan oclusiones vasculares y notables alteraciones pigmentarias.

4.5.1.3.- Zona periférica (Fig. 42)

En la retina interna sigue siendo notable el incremento del número de núcleos celulares presentes en la CFNO y CCG.

La CPI y la CNI se han recuperado. Permanece un ligero grado de edema y desestructuración en la CPE. La CNI y los segmentos externos de los fotorreceptores presentan menor grado de desestructuración y menor infiltración celular a medida que nos alejamos del centro del impacto. Esta zona puede persistir alterada si en su interior se encuentra alguna célula globosa cargada de pigmento que la desestructure.

Estas células cargadas de pigmento son escasas en la mayoría de las secciones, pero abundan células de rasgos similares pero de menor tamaño y con poco pigmento en su interior.

Las células del EPR presentan sólo una ligera hipertrofia y no se aprecia rotura de la membrana de Bruch.

La coroides presenta ligero edema y con una disminución en la cantidad de pigmento.

A continuación, en la Tabla 5 se recogen un resumen de los hallazgos histológicos en cada una de las capas, así como una gradación estimada de cada uno de ellos en la zona central y periférica.

Tabla 5. Resumen hallazgos histopatológicos 2 meses post-fotocoagulación con tinción de hematoxilina-eosina

HALLAZGOS Y LOCALIZACIÓN	AREA DE LA LESION	
	CENTRO	PERIFER IA
De MLI a CCG		
Ondulada	+	-
Alteración fibras de Müller	+	-
Edema	++	+
Desestructuración	++	+
Presencia de cél. no ganglionares	++	++
Vacuolización celular	++	++
CPI		
Edema	+	-
Alteración estructural	+	-
Presencia de cél. con y sin pigmento	+	-
CNI		
Edema	+	-
Presencia de cél. con y sin pigmento	+	-
Desde CPE hasta EPR		
Tejido de aspecto fibroso	++	+
Presencia con cél. de núcleo alargado	++	+
Células globosas con y sin pigmento	++	+
Pigmento extracelular	++	+
Recuperación citoarquitectura	-	+
EPR		
Hipertrofia celular	++	+
Células epiteliales desprendidas	++	.
Depigmentación	++	+
Células epiteliales conservadas	-	+
MEMBRANA DE BRUCH		
Continua	-	-
Discontinua	++	+
COROIDES		
Edema	++	+
Oclusiones vasculares	++	+
Presencia con cél. de núcleo alargado	++	-
Alteraciones pigmentarias	++	+

4.5.1.3.- Radios Medulares (Fig. 43)

En esta zona el número de núcleos presentes en la CFNO de las áreas lesionadas es mayor que en la de las áreas no lesionadas. Las alteraciones del resto de las capas retinianas no varían respecto a las descritas para la zona central o periférica.

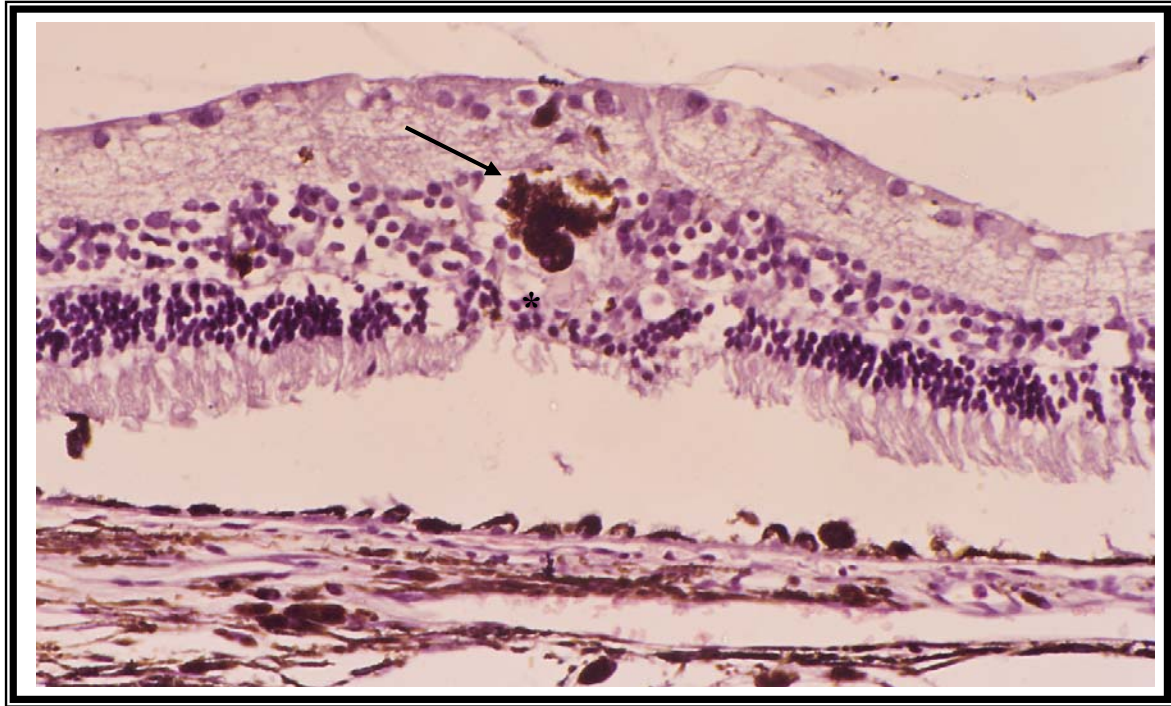


Fig. 41 . Zona central de la lesión 2 meses postfotocoagulación. Acúmulo de células pigmentadas situadas en la CPI (—→). Desestructuración de las capas retinianas más externas (*). Hematoxilina-eosina (250X).

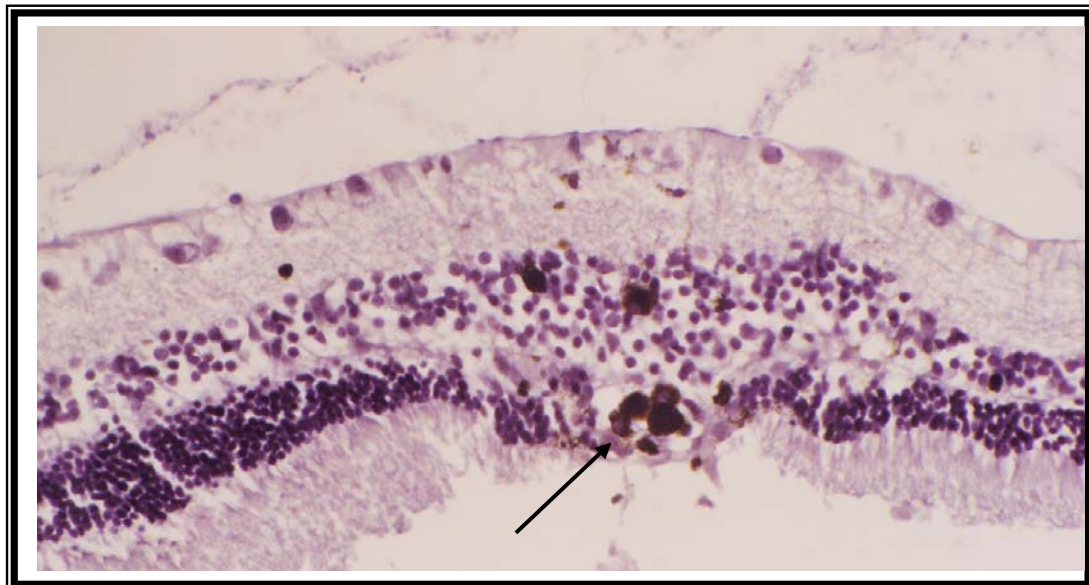


Fig. 42. Zona periférica de la lesión 2 meses postfotocoagulación. La citoarquitectura de la retina está más conservada. Se mantienen alteradas las capas más externas de la retina, pudiéndose encontrar células globosas cargadas de pigmento (—→). Tinción H-E (250 X).

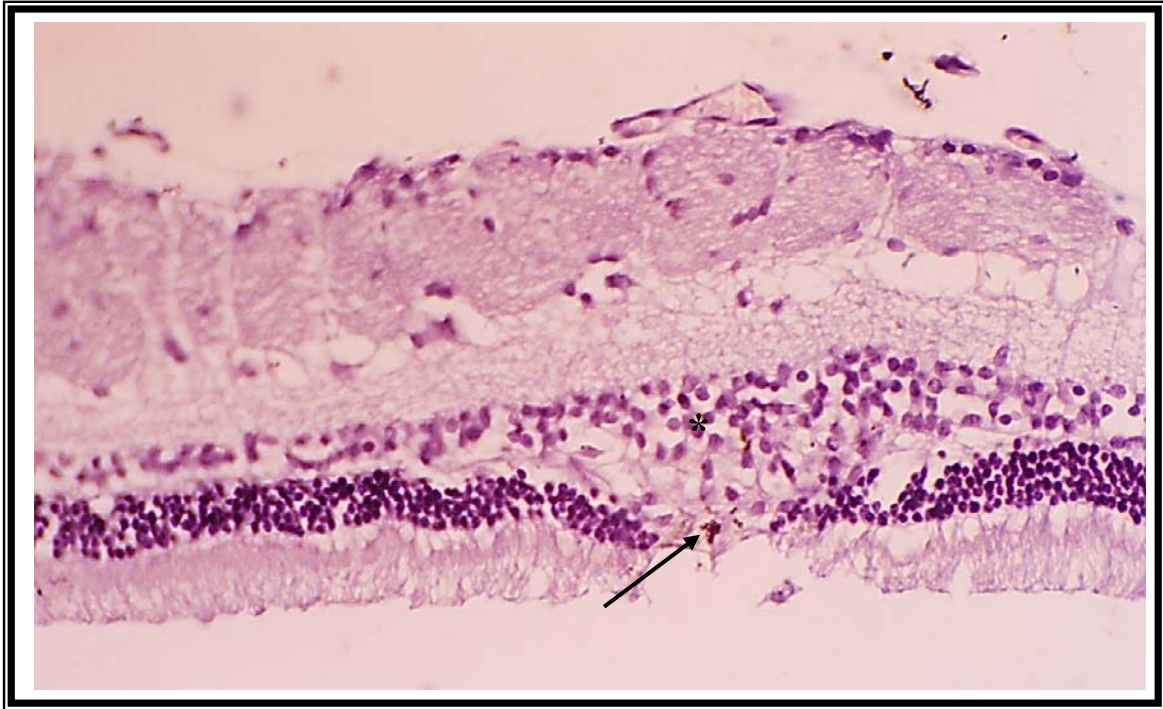


Fig. 43. Lesión 2 meses postfotocoagulación en el área de los radios medulares. Edema de la CNI y CPE (*) y alteraciones notables de los fotorreceptores (—→ Hematoxilina-eosina (250X).

4.5.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

4.5.2.1.- PGFA (Fig. 44 y 45)

El marcaje es muy intenso en la zona del tejido fibroso descrito anteriormente que limita los márgenes de la lesión en su superficie más externa. Este marcaje inmunopositivo coincide en ocasiones con la zona que presenta la mayor densidad de células pigmentadas, aunque éstas últimas no muestran marcaje positivo frente al anticuerpo contra la PGFA.

También se observa una inmunopositividad menos intensa en las capas más internas de la retina, fundamentalmente las terminaciones de las células de Müller en la MLI y sus proyecciones que atraviesan perpendicularmente la CFNO, CCG y CCG. A partir de esta capa no se ha observado marcaje positivo para estas células.

En el área de los radios medulares (Fig. 46), coincide la localización del marcaje con las dos distribuciones anteriores. Por un lado, se observa un marcaje inmunopositivo en el tapón fibroso de la capas retinianas más externas y por otro un aumento en el marcaje de estructuras más internas: MLI, CFNO y CCG. Los vasos epirretinianos dispuestos encima de la MLI presentan una inmunopositividad importante. Dentro de la CFNO, se observa un marcaje de una gran cantidad de

células de núcleo alargado que emite prolongaciones dispuestas entre los fascículos de los axones mielinizados.

4.5.2.2.- Lectinas (Fig. 47 y 48)

Presentan inmunomarcaje positivo las células grandes tanto las cargadas de pigmento como las que no lo tienen y que se localizan en las inmediaciones del EPR. Además, son inmunopositivas unas células de morfología aracnoide que también aparecen en las zonas no tratadas y que se sitúan principalmente en la CPI emitiendo sus prolongaciones tortuosas en todas direcciones en la misma CPI, hacia la CNI y CCG adyacentes. El núcleo se encuentra en CPI o en la CCG.

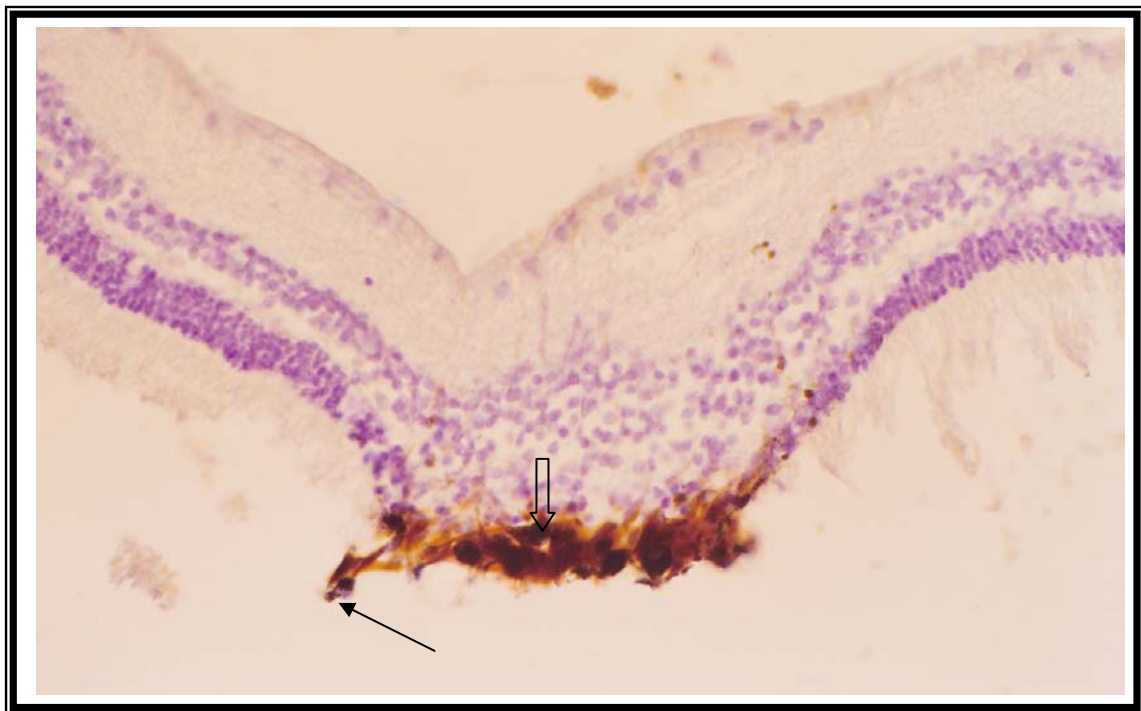


Fig. 44. Lesión 2 meses postfotocoagulación. Intenso inmunomarcaje en el borde más externo del tapón que ocupa la retina externa (\Rightarrow). Las células pigmentadas no presentan inmunomarcaje (\rightarrow). Inmunohistoquímica con PGFA (250X).

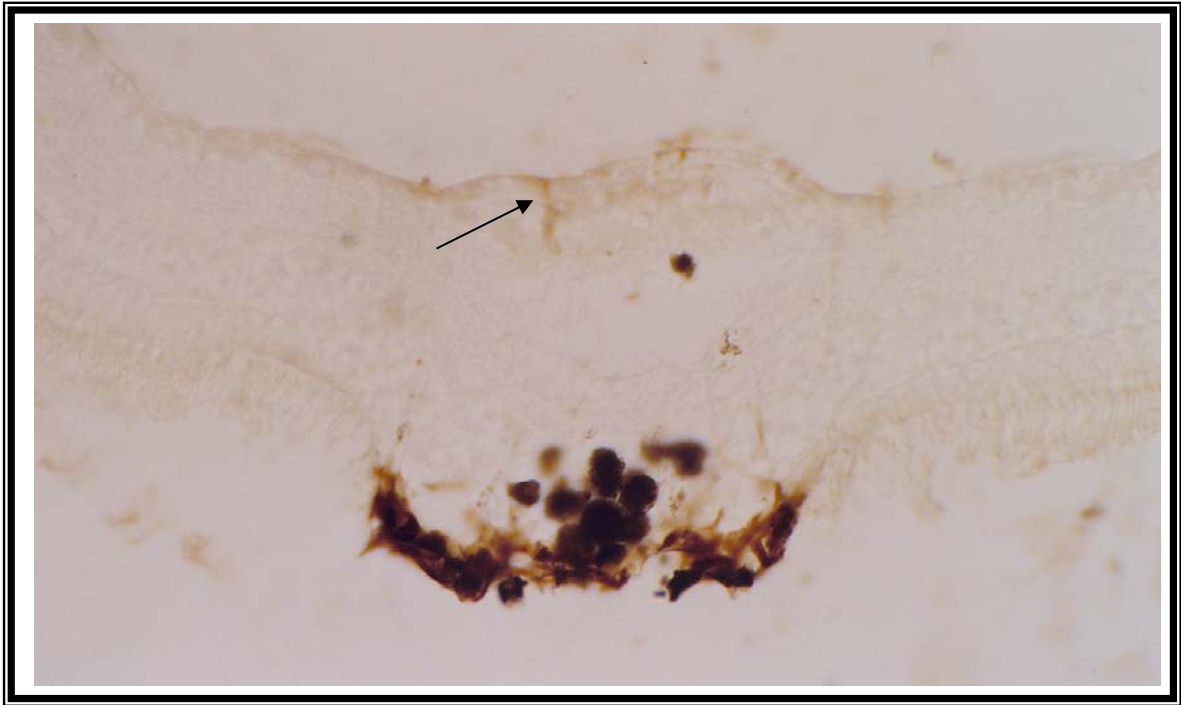


Fig. 45. Lesión 2 meses postfotocoagulación. Ligera inmunopositividad de las terminaciones más internas de la glía de Müller (→). Inmunohistoquímica frente a PGFA (500X).

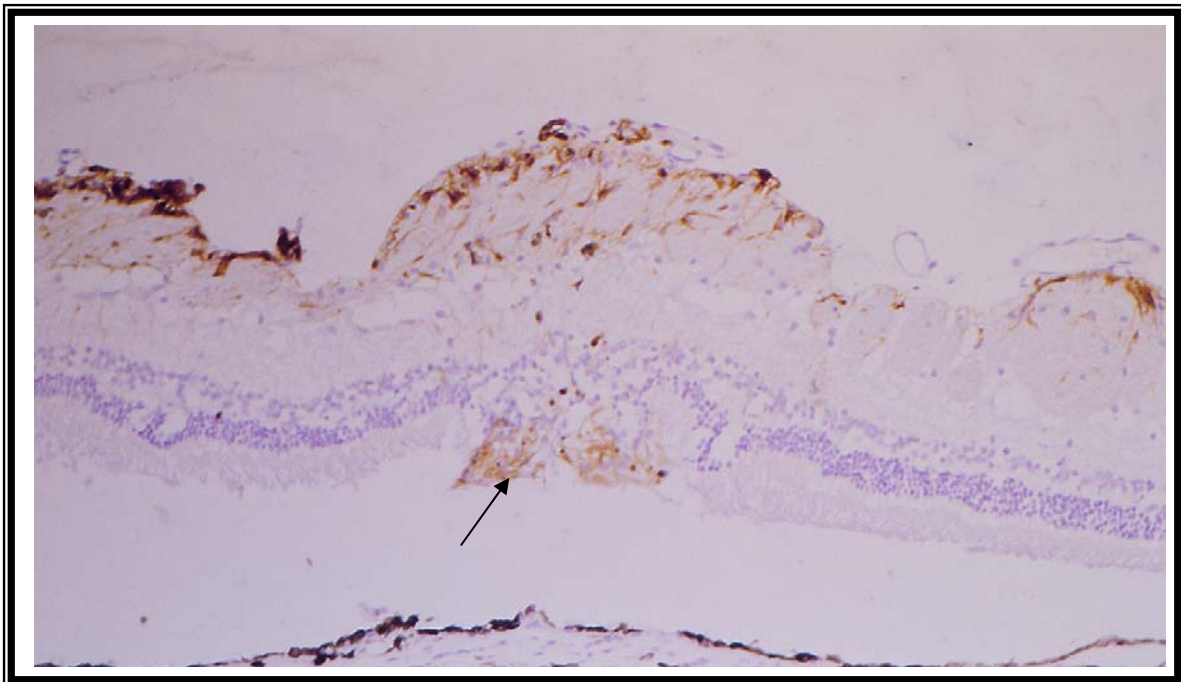


Fig. 46. Lesión 2 meses postfotocoagulación en el área de los raios medulares. Además del aumento en el marcaje de las capas más internas (MLI, CFNO y CCG), se observa un marcaje selectivo en la retina más externa (→). Tinción inmunohistoquímica frente a PGFA contrastada con hematoxilina. (250X)

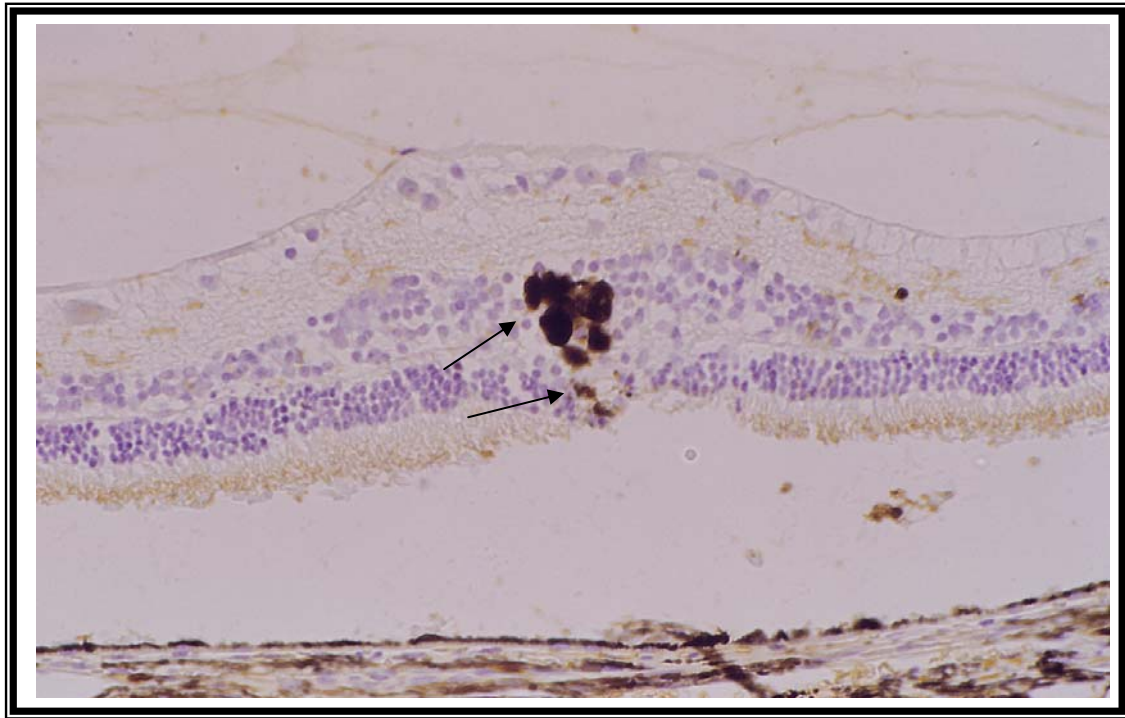


Fig. 47. Lesión 2 meses postfotocoagulación. Inmunomarcado positivo de las células cargadas de pigmento (—→). Inmunohistoquímica con lectinas (250X)

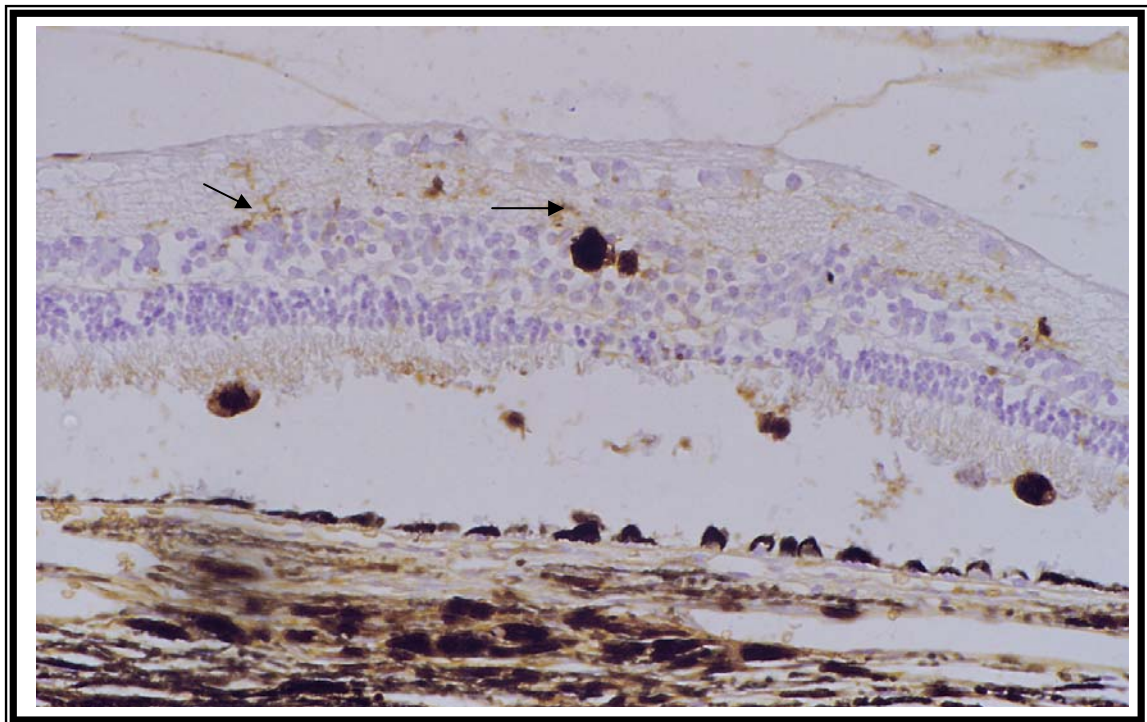


Fig. 48. Lesión 2 meses postfotocoagulación. Marcado inmunopositivo de células con cuerpo celular en la CPI y con morfología aracnoide tanto en las zonas tratadas como en las adyacentes no tratadas. (—→). Inmunohistoquímica con lectinas (250X).

5.- DISCUSIÓN

Las características e intensidad de los efectos producidos por la exposición de una superficie tisular a un haz luminoso dependen de diversos factores. Entre ellos destacan el patrón de absorción de la superficie tisular donde incide el haz luminoso, así como las características de la radiación incidente. La unión de estos dos conjuntos de factores ha sido ampliamente estudiada para definir modelos de lesión provocada por una radiación sobre un determinado tejido expuesto a la misma.

5.1.- GENERALIDADES SOBRE LA RADIACIÓN LÁSER

Antes de discutir las características de absorción de la superficie tisular fotocoagulada, que en el caso de esta tesis es el fondo ocular del conejo pigmentado, es necesario saber qué cantidad de la energía asociada a esa longitud de onda alcanza esa superficie. Esto significa determinar la fracción de la energía asociada a la radiación que es transmitida a través de los medios oculares, y la que es absorbida por los mismos, para poder calcular, con una aproximación razonable, la cantidad de energía que alcanza el tejido diana. La mayoría de los autores coinciden en que la curva de transmisión del medio ocular es muy similar a la del agua y que apenas hay diferencias entre los valores de transmisión del medio ocular en el conejo y en el hombre. Si los medios oculares atravesados por el haz luminoso no parecen ser determinantes de su transmisión, entonces deberá ser la longitud de onda utilizada y la estructura y composición del tejido diana (WIESINGER, 1956; GEERAETS, 1960, 1962, 1966, 1968; SOLON, 1961; ROSE, 1961, 1966; KIDWELL, 1976). La mayoría de los autores establecen para la longitud de onda utilizada en esta tesis doctoral, es decir 810nm, emitida por el láser de diodo y situada en el espectro del infrarrojo cercano, porcentajes de transmisión a través de los medios oculares superiores al 85 %, con pequeñas diferencias en algunos estudios (McHUGH, 1988).

Por lo tanto, asumiendo que un porcentaje muy elevado de la energía asociada al haz luminoso emitido por el láser de diodo en el infrarrojo cercano y aplicado de forma transpupilar, alcanza el fondo del ojo del conejo pigmentado, animal utilizado como modelo experimental, es necesario conocer las características del tejido diana donde ocurre la absorción y su relación con la radiación que alcanza esa superficie, para intentar explicar los efectos observados en la retina después de la fotocoagulación transpupilar.

5.2.- GENERALIDADES SOBRE EL TEJIDO DIANA

Con respecto al tejido diana, la retina de los conejos pigmentados, se debe prestar especial atención a dos aspectos: Por un lado, la presencia o ausencia y la distribución de los pigmentos supuestamente responsables de la absorción y por otro lado, las características anatómicas de fondo ocular de este animal. Ambos aspectos están muy relacionados, ya que cada pigmento o cromóforo se localiza en una estructura celular particular localizada en alguna de la decena de capas que constituyen la retina.

5.2.1.- EL LÁSER DE DIODO Y LOS PIGMENTOS OCULARES

Los cromóforos o pigmentos responsables de la absorción y por tanto determinantes en la fotocoagulación retiniana han sido ampliamente estudiados. Los de mayor importancia son la melanina presente en las células del EPR y melanocitos corioideos y la hemoglobina sanguínea y con una importancia menor y relativa, la xantofila macular y los pigmentos de los fotorreceptores.

La xantofila, sólo se encuentra en la zona macular existente en los primates pero ausente en los conejos, por lo que podemos excluirla como pigmento relevante en la fotocoagulación retiniana en éstos últimos. Por ello, hay que tener especial cuidado cuando se comparan los resultados obtenidos en conejos y en otras especies, especialmente primates, ya que en éstos el área macular sí posee xantofila y puede presentar distinta absorción dependiendo de la longitud de onda que se esté utilizando (BOWBYES 1973; CORTÉS 1990; MARSHALL 1975; PEYMAN 1983; SWARTZ 1986; THOMAS 1984). La xantofila o pigmento lúteo presenta importantes valores de absorción para longitudes de onda azul y verde, que disminuyen progresivamente hasta ser mínimos en el amarillo, rojo e infrarrojo. Debido a que la xantofila macular tiene una absorción mínima para longitudes de onda del infrarrojo cercano (BLAIR, 1972; CAMPBELL, 1966a,b; LAPPIN, 1970; LEIBOWITZ, 1969; L'ESPERANCE, 1989b; MAINSTER, 1983; MARSHALL, 1975; TSO 1977), la fotocoagulación con láser de diodo podría resultar una herramienta interesante y segura para el tratamiento de patologías maculares.

Por otro lado, se asume que la contribución de los pigmentos visuales presentes en los fotorreceptores a la fotocoagulación es mínima ya que no presentan una absorción específica.. Por tanto, quedan únicamente dos pigmentos como responsables principales de los efectos provocados por la fotocoagulación con el láser de diodo: la hemoglobina de la sangre que circula por los vasos y la melanina presente en las células del epitelio pigmentario de la retina y en los melanocitos corioideos.

La hemoglobina presenta una absorción muy baja para la longitud de onda roja (FOLCK, 1985; GEERAETS, 1962; L'ESPERANCE, 1966, 1968, 1989b; WOOD, 1969), y también para la longitud de onda infrarroja (810nm) emitida por el láser de diodo que estamos utilizando. Por lo tanto, la presencia o ausencia de hemoglobina en la retina no es un factor determinante en la explicación del efecto fotocoagulador aunque, el hecho de que la longitud de onda infrarroja no sea absorbida por la hemoglobina y penetre más profundamente en la coroides, hace del láser de diodo el método más seguro para el tratamiento de patologías corioideas o aquellas del fondo ocular en presencia de hemorragias pre o intrarretinianas (JOHNSON, 1995),.

Por todo ello, parece que el único pigmento que resulta determinante y responsable de los efectos provocados por la radiación infrarroja por láser de diodo sobre la retina de conejos pigmentados, es

la melanina, responsable de dicha pigmentación. Antes de comentar la absorción específica por la melanina, es necesario recordar la ley física básica que establece una relación inversa entre longitud de onda y cantidad de energía asociada. Es decir, la cantidad de energía asociada al haz luminoso es considerablemente inferior si se trata del infrarrojo cercano (810nm) o de longitudes de onda más cortas del espectro visible, como el ultravioleta, azul, verde, amarillo, naranja y rojo, emitidas por otros láseres utilizados en oftalmología, como el láser de argón, kriptón o láser teñido con colorantes orgánicos (dye laser). En el espectro de absorción de energía lumínica de la melanina destaca la disminución de la absorción a medida que aumenta la longitud de onda. En las longitudes de onda roja (alrededor de los 600nm) emitidas por el láser kriptón rojo la absorción supera el 60% de la energía incidente, mientras que en la longitud de onda infrarroja (810nm) emitida por el láser de diodo la absorción es alrededor del 20% (GEERAETS 1960, 1962, 1966; MAINSTER 1986, 1989). Este fenómeno podría explicar, según algunos autores (BALLES, 1990a,b; BENNER 1992; MARSHALL, 1981; McHUGH, 1988) que, utilizando los mismos parámetros de intensidad, diámetro del spot y tiempo, las lesiones retinianas producidas con el láser de diodo sean menos intensas que las producidas con el láser de kriptón rojo. Es decir, en su opinión, es necesario utilizar potencias más elevadas con el láser de diodo, para provocar lesiones similares a las obtenidas con longitudes de onda mas cortas, emitidas por otros láseres, como el láser de argón. Sin embargo, en otros trabajos comparativos se concluye que, a pesar de que la absorción por la melanina disminuye a medida que aumenta la longitud de onda, cuando se utilizan emisiones entre 800-900nm se necesita menor cantidad de energía que las teóricamente esperables. Esto apoya la hipótesis, expuesta por primera vez por Lund y ampliamente discutida por otros trabajos (BRANCATO, 1988, 1989; PULIAFITO, 1987; SLINEY, 1993), de que exista un cromóforo especial que absorba específicamente en el rango de 800-900nm. .

Se acepta que, cuando se utilizan emisiones con longitudes de onda dentro del espectro visible de radiación, la melanina del EPR es el sustrato principal que absorbe la mayor parte de la energía. La absorción de energía por la melanina disminuye a medida que aumenta la longitud de onda y por tanto, aunque la melanina de las células del EPR, son el primer y principal tejido diana donde ocurre la absorción de energía, cuando se utilizan longitudes de onda largas dentro del espectro visible, una gran parte de la energía asociada atraviesa el EPR y alcanza la coroides. En este sentido, son numerosos los trabajos que demuestran que el porcentaje de energía asociada, que atraviesa el EPR y alcanza los melanocitos coroides es mayor con longitudes de onda largas del infrarrojo cercano emitido por el láser de diodo que con longitudes de onda más cortas (ANDRÉS, 1993; BALLES, 1990a,b; BENNER, 1992; BRANCATO, 1989; JOHNSON, 1995; LANZETTA, 2005; MARSHALL, 1981; McHUGH, 1988; MENCHINI, 1992; OBANA, 1992; SLINEY, 1993; VAN DER ZYPEN, 1990; VOGEL, 1992; WALLOW, 1991). De igual forma, en prácticamente todas nuestras preparaciones se observa una afectación coroidea, destacando las alteraciones vasculares y pigmentarias que alcanzan incluso la supracoroides. Por ello, en general, la mayoría de los trabajos utilizan mayores potencias o tiempos de exposición, es decir mayores densidades de energía, cuando se comparan

lesiones provocadas por los láseres del infrarrojo cercano en comparación con longitudes de onda en el visible.

5.2.2.- CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

La mayor parte de la retina de los conejos carece de vasos sanguíneos y por tanto de hemoglobina, a excepción de la zona de los radios medulares (TRIVIÑO, 1988, 1997). En esta región, a ambos lados de la papila óptica, las fibras nerviosas de la CFNO son gruesas, debido a la envuelta de mielina que las rodea, y aparecen protuberantes hacia el interior vítreo. Esta región es la única zona vascularizada de la retina de los conejos; mientras que la retina de los primates presenta una extensa vascularización en las capas más internas de la retina. Por lo tanto, hay dos grandes diferencias anatómicas entre la retina de los conejos y los primates: la de los conejos es avascular, a excepción de los radios medulares y carente de mácula, mientras que la de los primates está vascularizada, a excepción de la zona macular de máxima sensibilidad visual (WALLOW, 1973 a,b,c; TRIVIÑO 1991). Estas características anatómicas hay que tenerlas muy presentes cuando se trate de comparar los efectos fotocoagulativos producidos con cualquier láser en conejos o en monos y humanos. En los conejos, sólo si se efectúa la fotocoagulación del área de los radios medulares es preciso tener en cuenta la presencia de hemoglobina, mientras que el resto de la retina, avascular, resulta un buen modelo para simular condiciones similares a las de la fovea de la mácula de los primates, ya que es ésta la única zona avascular de estas especies.

Las lesiones provocadas por los impactos del láser de diodo incidentes sobre la zona de los radios medulares (zona vascular y con oligodendroglía), no deberían suponer apenas ninguna modificación en el modelo de lesión que discutiremos, en comparación con las alteraciones provocadas en las otras regiones de la retina, ya que la presencia de los radios medulares, es decir de fibras nerviosas envueltas de mielina, no influye en las características de absorción de la superficie retiniana, porque la mielina es transparente y no presenta absorción por esta longitud de onda (párrafo largo con muchas ideas encadenadas). Por otro lado, la zona de los radios medulares es la única zona vascularizada en el fondo ocular del conejo, pero la hemoglobina sanguínea, como hemos comentado anteriormente, tiene una muy pobre absorción por la longitud de onda infrarroja (810nm) ya que su máxima absorción está entre los 500 y 600nm (FOLCK, 1985; GEERAETS, 1962; L'ESPERANCE, 1966, 1968, 1989b; WOOD, 1969) por lo que la presencia de vasos sanguíneos que contienen hemoglobina "a priori" no debería tampoco modificar en absoluto el patrón de lesión (párrafo largo con muchas ideas encadenadas).

Aunque el hecho de que la presencia de hemoglobina teóricamente no debería influir en el tipo de lesión, la presencia de vasos sanguíneos puede disipar el calor producido en la zona de absorción de la energía, por fenómenos de conducción, provocando una disminución de la temperatura (HAUT, 1981; L'ESPERANCE 1966). Este fenómeno podría explicar una disminución de la intensidad de los efectos en la zona fotocoagulada cuando se trata de los radios medulares en comparación con otras zonas avasculares. Además, el aumento del grosor retiniano de la zona de los radios medulares por

los oligodendrocitos mielínicos, también provoca una disminución, atenúa o aminora la intensidad de la energía que alcanza el EPR. Aunque la mielina no presente absorción por la longitud de onda infrarroja, a medida que un haz luminoso atraviesa distintas superficies, va perdiendo parte de su energía.

5.3.- USO TERAPÉUTICO DE LA FOTOCOAGULACIÓN CON LÁSER DE DIODO

5.3.1. VENTAJAS Y POSIBILIDADES

5.3.1.1. Tratamientos en el fondo ocular en presencia de hemorragias prerretinianas u opacidades del cristalino

Ya que la absorción de la energía asociada al infrarrojo es prácticamente nula por parte de la hemoglobina sanguínea, la utilización de estas longitudes de onda emitidas por el diodo, pueden resultar ventajosas en presencia de hemorragias prerretinianas, así como en las opacidades del cristalino (BALLES, 1990a,b; L'ESPERANCE, 1969; MARSHALL, 1979; PEYMAN, 1981; SMIDDY, 1992b).

En las retinas vascularizadas, como la humana, los vasos se encuentran fundamentalmente acompañando a los haces nerviosos, en las zonas más internas de la retina. El hecho de que la longitud de onda infrarroja no sea absorbida por la hemoglobina sanguínea, disminuye la posibilidad de absorción, y por tanto de lesión, en esa zona más interna de la retina. Este hecho aumenta la conservación de los haces nerviosos y además disminuye la posibilidad de afectación de la barrera hematorretiniana (BHR). La afectación de la BHR puede inducir el desarrollo de la vitreoretinopatía o formación de membranas epirretinianas, efecto indeseable y secundario en muchas ocasiones al tratamiento fotocoagulador de la retina (VOGEL, 1992)

5.3.1.2. Retinopexia

Una de las aplicaciones terapéuticas de la fotocoagulación es la retinopexia retiniana en el caso de su desprendimiento y el láser de diodo ha demostrado lograr adhesiones coriorretinianas (DUKER, 1989; MENCHINI, 1992; PULIAFITO, 1989; SMIDDY, 1992a,b), como hemos corroborado en gran parte de nuestras preparaciones. En opinión de Menchini, 1992 (MENCHINI, 1992) en la retinopexia con láser, el éxito clínico no es obtenido por el hecho de obtener la ablación de la retina, sino que deriva de la estimulación de la reacción celular que se provoca y que permite la formación de una fuerte adhesión coriorretiniana. Para conseguir esto, los impactos del láser sobre la retina deben producir lesiones de una intensidad media y de tipo térmico fotocoagulativo, evitando el efecto teromecánico, fotodisruptor.

Las células epiteliales son el primer y principal tejido de absorción de energía (HAUT, 1981; LIN, 1993, MAINSTER, 1986, 1989; PEYMAN, 1984), porque como señalan diversos autores (MAINSTER, 1986, 1989; McHUGH, 1988, 1995; PULIAFITO, 1987; SLINEY, 1992; VOGEL, 1992),

la concentración de melanina en las células del EPR, es mucho mayor que en la coroides, donde este pigmento se encuentra más disperso. Así pues, la cantidad de energía absorbida por unidad de volumen en estas células del EPR es mucho mayor que en los melanocitos coroides. La energía asociada a la longitud de onda incidente se transforma en calor en la zona apical de estas células epiteliales. El calor provoca una elevación de la temperatura que, por fenómenos de conducción, alcanza zonas adyacentes de retina y coroides no afectadas directamente por el haz luminoso (BORGES, 1987; KATOH, 1988; L'ESPERANCE, 1965, 1966, 1968; MAINSTER, 1989; TSO, 1973, 1977; VOGEL, 1992; WALLOW, 1977). En nuestra opinión, este aumento de la temperatura es el responsable del denominado "efecto térmico" fotocoagulador, coincidiendo con otros trabajos (BÜLOW, 1978; HAUT, 1981; L'ESPERANCE, 1968; LIN, 1993; MAINSTER, 1983, 1986, 1989; MARSHALL, 1975, 1981; MORÓN-SALAS, 1950; NOYORI, 1963; POWELL, 1971; TSO, 1973) y el "blanqueamiento" en el fondo ocular.

5.3.1.3.- Tratamiento de patologías y alteraciones vasculares coroides

Aunque es cierto, que la mayoría de la energía asociada a la longitud de onda infrarroja emitida por el láser de diodo se absorbe en la melanina del EPR, una cantidad relativamente importante de energía alcanza la coroides, donde la distribución de la melanina en los melanocitos coroides es más variable que en el EPR y entre individuos (OBANA, 1992; VOGEL, 1992).

El hecho de que longitudes de onda del infrarrojo cercano alcancen mayor profundidad en la coroides, aumenta su amplio espectro de aplicaciones ya que puede ser utilizado de forma segura en el tratamiento de tumores y patologías vasculares coroides sólo o junto a la combinación con indocianina verde (BALLES, 1990b; BRANCATO, 1989; DUKER, 1989; LANZETTA, 2005; MENCHINI, 1992; VOGEL, 1992; WALLOW, 1991).

5.3.2.- DESVENTAJAS E INCONVENIENTES

La energía asociada al rayo láser es inversamente proporcional a la longitud de onda emitida; por lo que la fotocoagulación con láser de diodo que emite en el infrarrojo cercano (810nm) necesita mayores potencias de emisión para obtener lesiones similares a las obtenidas con longitudes de onda más cortas, en el rango del visible. Además, el retraso en el blanqueamiento oftalmoscopio cuando se utiliza el diodo, señalado en algunos trabajos, puede llevar a alargar la duración de la emisión en exceso y provocar una sobredosis en la exposición indeseable (MENCHINI, 1992; OBANA, 1992). Como en la práctica clínica, cuanto menor sea la cantidad de energía necesaria para obtener una lesión en el fondo ocular (blanqueamiento), mayor es la eficacia clínica del dispositivo o aparato (SLINEY, 1993), parece entonces que la fotocoagulación con el láser de diodo no debería tener gran atractivo clínico (BALLES, 1990a,b; BENNER, 1992; BRANCATO, 1989; LANZETTA, 2005; VOGEL, 1992). Sin embargo cuando el efecto terapéutico se basa fundamentalmente en una lesión térmica, la importancia de la elección de la longitud de onda es relativa, como señalan

algunos autores. De hecho, láseres con emisiones de diferentes longitudes de onda, pueden provocar similares lesiones coriorretinianas y por tanto similar eficacia terapéutica (LANZETTA, 2005; MAINSTER, 1986; McHUGH, 1988, 1989; SLINEY, 1993; VOGEL, 1992. Parece pues, que el hecho de que el láser de diodo necesite emitir mayor cantidad de energía para obtener una lesión oftalmoscópica similar, en comparación con otros láseres convencionales, no tiene por qué suponer un inconveniente o desventaja para su uso clínico.

Cuando la elevación de la temperatura local en la zona del impacto es muy elevada o muy rápida, pueden formarse burbujas por la evaporación de los fluidos tisulares. Estas burbujas provocan importantes alteraciones y roturas tisulares de tipo mecánico. Por lo tanto, al efecto térmico que define la lesión coagulativa con exudados se le puede superponer un efecto “mecánico”, mejor denominado “termomecánico”, que incluye la evaporación de líquidos sin exudados (LANZETTA, 2005; McHUGH, 1988, 1990, 1995; TRIVIÑO, 1995, 1997; VAN DER ZYPEN, 1986). Este fenómeno puede provocar en la retina externa un desplazamiento físico masivo con rotura de estructuras como la MB o la coriocapilar subyacente.

Debido a las diferencias antes señaladas en los porcentajes de absorción dependiendo de la longitud de onda incidente, algunos autores han pretendido identificar una longitud de onda óptima específica para cada aplicación terapéutica. Sin embargo, parece que, cuando se utilizan los modos de emisión en continuo, el efecto térmico provocado por la conversión de la energía en calor y consiguiente aumento de la temperatura es casi el único responsable de las características de la lesión y por tanto, el valor en la práctica clínica de una absorción selectiva en función de la longitud de onda utilizada es mínimo (ANDRÉS, 1993; BALLE, 1990b; McHUGH, 1988; SLINEY, 1993)

Aunque la absorción de la energía asociada a longitudes de onda larga por la hemoglobina es pobre y por lo tanto, teóricamente disminuiría el riesgo de provocar hemorragias, el hecho de que la energía asociada a longitudes de onda larga alcance mayor profundidad en la coroides, donde se encuentran los vasos de mayor calibre, puede ser considerada como una desventaja para su uso, ya que algunos autores lo relacionan con la aparición de un mayor número de hemorragias (OBANA, 1992). Sin embargo, según algunos autores (McHUGH, 1988; VAN DER ZYPEN, 1990), el riesgo de hemorragias no sólo está determinado por la longitud de onda o la intensidad, sino también por el modo de emisión. Los modos pulsantes, y la corta duración del pulso se relacionan con la velocidad de conversión en gas de los fluidos tisulares, como ocurría con el efecto termomecánico en la retina. Cuanto más rápida es la elevación de la temperatura en los tejidos provocada por los modos pulsantes, más rápida será la transición de fase (de líquido a gas) y los cambios en el volumen y más importantes y frecuentes serán las lesiones, como roturas en la MB, que cuando se utilizan los modos de emisión en continuo (no está clara la idea). Para evitar provocar hemorragias, se recomienda disminuir la intensidad de la emisión y aumentar los tiempos de exposición. Una estrategia intermedia consistente en trenes de pulsos repetitivos con intensidades subumbrales

permitiría teóricamente crear efectos coagulativos térmicos evitando las hemorragias (SLINEY, 1992, 1993) y optimizando la fotocoagulación con la menor cantidad de energía.

Otra desventaja podría estar en el hecho de que en las capas coroideas más profundas además de los grandes vasos, también se encuentran los nervios más importantes que pueden resultar afectados pudiendo causar molestias e incluso dolor durante la fotocoagulación, como señalan algunos autores (BALLES, 1990b; GABEL, 1992; McHUGH, 1988; MENCHINI, 1992; WALLOW, 1991), aunque en otros trabajos se señala que, a pesar de la profundidad coroidea alcanzada, no se observan daños en los nervios ciliares (SMIDDY, 1992a; WALLOW, 1991).

Independientemente de las ventajas y desventajas de la fotocoagulación con diodo anteriormente expuestas, el láser de diodo tiene una serie de características de diseño adicionales que le confieren un atractivo especial para su uso clínico. Entre ellas, la posibilidad de su uso en forma de pulsos repetitivos, su mayor eficacia en la consecución de potencias de salida, ausencia de necesidad de circuitos de refrigeración, una vida útil más larga, necesidad de mínimo mantenimiento, tamaño compacto del aparato y coste relativamente bajo (BRANCATO, 1988; 1989; DUKER, 1989; LANZETTA, 2005; McHUGH, 1988, 1990; OBANA, 1992; PULIAFITO, 1987; SMIDDY, 1992a; WALLOW, 1991).

5.4.- LOS TIEMPOS DE OBSERVACIÓN Y TINCIONES UTILIZADAS

La elección de los tiempos de observación a los 3 y 7 días, 2 semanas, 1 y 2 meses, se ha realizado para estudiar los procesos y células implicadas en la reparación retiniana, ya que está generalmente aceptado que la reparación de la retina tras una lesión fotocoagulativa, está todavía en progreso a los 4 días después de la fotocoagulación y prácticamente se completa al mes.

Con las técnicas básicas de tinción de hematoxilina-eosina se ha pretendido obtener una visión general de la citoarquitectura retiniana, mediante la observación de los núcleos y cuerpos de los elementos celulares dispuestos en capas, aunque, la individualización celular es bastante limitada. Por ello, se ha complementado este estudio morfológico básico con técnicas inmunohistoquímicas que permiten seleccionar específicamente algunas estirpes celulares, en particular las gliales que son importantes en el proceso de recuperación de las lesiones retinianas.

Por un lado, se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas de marcaje frente a la proteína glio fibrilar ácida (PGFA), para estudiar la implicación de dos estirpes macrogliales presentes en la retina del conejo: la astroglia y la glía de Müller.

Durante mucho tiempo y en numerosos estudios se ha admitido que en la retina de los conejos la astroglia, que presenta inmunorreactividad positiva frente a la PGFA, se encuentra limitada únicamente a la zona vascularizada, es decir a la región de los radios medulares. De hecho, el criterio utilizado para su clasificación, ha sido la relación de los astrocitos con los axones de las

células ganglionares o con los vasos sanguíneos (REICHENBACH, 1987; SCHNITZER, 1987b, 1988a, 1988b, 1988d; STONE, 1987; TRIVIÑO, 1988; 1990; 1992) y dentro de estos dos tipos, se aludía a la morfología e intensidad del marcaje PGFA para establecer subtipos.

La combinación de técnicas inmunocitoquímicas, inmunohistoquímicas y microscopía electrónica mostraron la existencia de células astrogliales fuera de la zona de los radios medulares, localizados en las capas más internas de la retina (HADDAD, 2001).

La PGFA forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células astrogliales, y su marcaje mediante técnicas inmunohistoquímicas ha resultado ser un excelente método para observar selectivamente estas células gliales (BIGNAMI, 1972; GHANDOUR, 1979; DAVISON, 1971; LAZÁRIDES, 1980; LESSEL, 1963; RAMÍREZ, 1994; REICHENBACH, 1987; SCHNITZER, 1985, 1986, 1987b, 1988a, 1988b; STONE, 1987; TRIVIÑO, 1988, 1990, 1992; UYEDA, 1972). Dicha estirpe celular tiene una gran variedad de funciones y está implicada en la conservación y mantenimiento de las células neuronales que acompaña y en la formación de la cicatriz glial, por lo que su estudio es importante para conocer su afectación y su implicación en la evolución de la lesión. Sin embargo, la elección de la PGFA como marcador inmunohistoquímico, más que por el marcaje selectivo de la astroglia, que en el caso de la retina del conejo se limita a la zona de los radios medulares, se debe al marcaje selectivo de la glía de Müller en retinas alteradas por lesión, trauma o patología ocular.

La glía de Müller, es una célula de gran tamaño, específica de la retina, que ocupa gran parte del espesor retiniano; siendo la responsable de la formación de las membranas limitantes y mantenimiento de la citoarquitectura retiniana. Esta estirpe celular se caracteriza por su gran resistencia, como destacó Wolter en 1959 (WOLTER, 1959) quien describe que en los procesos de envejecimiento, estas células son el único tipo glial que permanece hasta el final (de qué?). Por ello, resulta de interés conocer su grado de alteración, su respuesta al daño y su implicación en la evolución de la lesión, ya que una mayor conservación de estas células implicaría una mayor conservación de toda la citoarquitectura retiniana. Como se ha señalado, la glía de Müller, presenta una peculiar característica en relación con el marcaje inmunohistoquímico frente a la PGFA; en condiciones normales, la glía de Müller presenta un marcaje negativo para el anticuerpo frente a la PGFA, contrariamente a la astroglia. Sin embargo, por un mecanismo todavía en discusión, la glía de Müller se hace PGFA (+) en diferentes situaciones provocadas por lesiones, patologías e incluso el envejecimiento (BARBER, 2000; BIGNAMI, 1979; BJÖRKLUND, 1985a, 1985b; HUMPHREY, 1993, 1996; RAMÍREZ, 2001; SCHERER, 1991; SCHNITZER, 1990; THANOS, 1992). Esta singular característica nos ha permitido, utilizando un sólo marcador inmunohistoquímico, poder discutir simultáneamente la respuesta de la astroglia y de la glía de Müller a la fotocoagulación retiniana, y su posible implicación en la evolución de las lesiones provocadas por el láser de diodo en el fondo de ojo de conejos pigmentados.

Por otro lado, también hemos utilizado técnicas inmunohistoquímicas con lectinas, con el objeto de marcar selectivamente las células microgliales y poder estudiar la respuesta ante el daño neural de esta estirpe glial, que según la bibliografía previa, participan activamente en los procesos de recuperación de lesiones en tejido nervioso. Las células microgliales, en situaciones normales no patológicas se sitúan fundamentalmente en la CPI, con forma estrellada y uniformemente distribuida. También se localizan, pero en menor abundancia en la CFNO acompañando a los axones de las células ganglionares y en este caso su morfología es más alargada. Por último de forma esporádica se pueden localizar en la CPE. Las proyecciones que emiten desde su cuerpo celular localizado a estos tres niveles pueden alcanzar capas adyacentes. Sin embargo, como señalan trabajos previos (HUMPHREY, 1996; SCHNITZER, 1990) la distribución y abundancia de estas células puede variar ante situaciones patológicas o traumáticas que afecten al sistema ocular.

Tras el marcaje inmunohistoquímico, ya sea con PGFA o con lectinas, hemos procedido a contrastar algunas preparaciones con hematoxilina, con objeto de facilitar, aclarar o confirmar la localización y distribución más exacta de los marcajes inmunohistoquímicos en la compleja citoarquitectura retiniana compuesta por 10 capas.

5.5.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A CORTO PLAZO (3 DÍAS)

5.5.1.- HEMATOXILINA EOSINA

En la descripción general de la lesión con la tinción de hematoxilina-eosina tras 3 días postfotocoagulación hay que tener en cuenta tres aspectos importantes.

En primer lugar, la morfología general de la lesión es cóncava, es decir destaca una protrusión retiniana hacia el interior del vítreo, descrita tanto en corte histológico como por microscopía electrónica de barrido (BRANCATO, 1988; LANZETTA, 2005; McHUGH, 1988), originada fundamentalmente por el mayor grosor que tiene la retina en la zona del impacto debida al edema; sin embargo la imagen histológica de las capas nucleares retinianas presenta una imagen cóncava, provocada por la entrada del rayo perpendicularmente a la citoarquitectura retiniana en capas arrastrándolas en su recorrido hasta el lugar primario donde ocurre la absorción de la energía asociada, las células del EPR.

En segundo lugar, coincidimos con aquellos trabajos que describen que el área de alteraciones que se observa en la retina es superior al área directamente fotocoagulada determinada por el diámetro del impacto, posiblemente debido a la difusión del calor desde la zona de absorción hacia la periferia (HUMPHREY, 1993; McHUGH, 1988). En este sentido McHugh (McHUGH, 1988) destaca que cuando el mecanismo del daño es térmico, cuanto mayor es el tiempo de exposición, más amplia es la extensión del límite térmico y mayor es el daño de los tejidos adyacentes.

En tercer lugar, en la descripción de la lesión obtenida a corto plazo hacemos una división del área afectada en tres zonas concéntricas: central, intermedia y periférica. En la mayoría de los trabajos publicados, únicamente se hace referencia a la zona central y en algunas ocasiones se hace mención a la disminución de la intensidad observable en la periferia de la lesión. En la descripción de nuestros resultados a los tres días postfotocoagulación, como en otros trabajos (BRANCATO, 1988; McHUGH, 1988), hacemos referencia a la existencia de una zona intermedia que tiene características especiales y por ello una descripción aparte, coincidiendo con Brancato (BRANCATO, 1988) en que a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la fotocoagulación, se pierde la nitidez en la clasificación de estas tres áreas, siendo suficiente comentar la zona central y periférica, como hemos hecho con nuestros resultados a partir de los 7 días postfotocoagulación.

Retina interna

Como destacamos en nuestros resultados, las alteraciones de la retina interna son notables, tanto en la zona intermedia, como en la zona central; lo que contrasta con trabajos histológicos previos en conejos (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; DUKER, 1989; PULIAFITO, 1987; SMIDDY, 1992a; TRIVIÑO 1995), monos (WALLOW, 1991) y en humanos (McHUGH, 1990), que describen una relativa conservación de las capas más internas. Algunos trabajos describen algunas alteraciones de la retina interna, de diferente grado, no muy intensas, variables y generalmente relacionadas con cantidades de energía notablemente superiores a la utilizada en este trabajo, o con el uso de modos de emisión de energía no continuos o con técnicas de fotocoagulación diferentes, sin utilizar la lámpara de hendidura (SMIDDY, 1992a,b; VAN DER ZYPEN, 1990; WALLOW, 1991). En nuestro trabajo, las capas retinianas internas aparecen intensamente alteradas, con una picnosis notable de la mayoría de núcleos existentes en la CNI, también descrita por algún trabajo previo (BRANCATO, 1989; MENCHINI, 1992; SMIDDY, 1992a). Esta picnosis nuclear refleja la muerte celular que ha alcanzado estos niveles, no sólo en los fotorreceptores. En algunas nuestras preparaciones, es clara la afectación de la MLI, contrariamente a lo descrito por otros trabajos que aluden a su continuidad confirmada en estudios ultraestructurales (BRANCATO 1988, 1989). Sin embargo, mientras con MO destacamos la aparente conservación de la CPI, estudios ultraestructurales describen un notable edema y pérdida de su estructura característica (BRANCATO, 1989). La vacuolización celular de las células ganglionares descrita aparece también referida en trabajos con MO (SMIDDY, 1992a) o con MET (BRANCATO, 1989).

Estas significativamente y no esperadas intensas alteraciones de las zonas más internas de la retina, señaladas en algunos trabajos, podrían estar relacionadas con la existencia de un cromóforo específico para longitudes de onda infrarrojas como expone Lund (McHUGH, 1990; SLINEY, 1993), al igual que ocurre con las longitudes de onda azules y la xantofila o las longitudes de onda naranjas y algún otro cromóforo por determinar (ANDRÉS, 1993; SMIDDY, 1988). En nuestra opinión coincidente con algún trabajo (McHUGH, 1990), se deben al efecto termomecánico y paso de la onda de movimiento de fluidos vaporizados que se crea en la zona principal de absorción, que a su vez

varía mucho en función de la pigmentación del tejido, lo que explicaría la variabilidad en las alteraciones descritas en distintas preparaciones del mismo animal, entre animales e igualmente reflejadas en la variabilidad de la descripción de la bibliografía.

Retina externa

Nuestros resultados coinciden con la mayoría de los estudios realizados con conejos y láser de diodo, destacando una afectación clara e intensa de la retina externa, que en ocasiones se refiere como necrótica, no muy diferente a la obtenida con láseres de otras longitudes de onda como la verde del argón o la roja del kriptón (BENNER, 1992; DUKER, 1989; MENCHINI, 1992; PEYMAN, 1980, 1983; PULIAFITO, 1987; SATO, 1992; SMIDDY, 1992a; WALLOW, 1991). Las alteraciones celulares incluyen la picnosis nuclear de los núcleos de los fotorreceptores en la CNE. Entre los segmentos externos de estas células es frecuente la presencia de exudado y suelen aparecer desprendidos de las subyacentes células del EPR. Estas células epiteliales son generalmente descritas, como en nuestro trabajo, edematosas, hipertróficas y con alteraciones de su pigmento intracelular (BENNER, 1992; BRANCATO, 1987, 1988, 1989; DUKER, 1989; LANZETTA, 2005; McHUGH, 1988, 1990, 1995; MENCHINI, 1992; PULIAFITO, 1987; SATO, 1992; SMIDDY, 1992a,b; TRIVIÑO, 1995). Estos resultados coinciden principalmente con los que hemos descrito para la zona intermedia, donde al igual que en los estudios de Brancato en conejos (BRANCATO, 1988) y McHugh en conejos y humanos (McHUGH, 1988; 1990), la zona intermedia presenta un alto grado de desestructuración y vacuolización celular localizado fundamentalmente en las capas retinianas más externas y con las células del EPR hipertrofiadas y con alteraciones pigmentarias.

Estas intensas alteraciones de la retina externa descritas en nuestra área intermedia difieren significativamente de las descritas para la zona central, donde estos segmentos externos se encuentran aparentemente perfectamente conservados, alineados, formando una empalizada, siendo perfectamente visible la MLE, así como las células del EPR de aspecto aplanado y conservado y la membrana de Bruch subyacente conservada y continua. Similares observaciones han sido descritas por Lanzetta, inmediatamente posterior a una irradiación moderadamente más alta que la empleada por nosotros (LANZETTA, 2005). Esta aparente “excelente” conservación de la retina externa en la zona central del impacto, contrasta con la observación de las zonas no tratadas, donde como artefacto de las técnicas de fijación y teñido así como manipulación de las muestras, es patente un desprendimiento de la retina, de forma que los fotorreceptores suelen aparecer desunidos del EPR, afectando a la MLE. Es decir, pensamos que el hecho de que en la zona central del impacto descrita en nuestros resultados, paradójicamente aparezca una unión de los fotorreceptores al EPR que no aparece en las zonas retinianas no tratadas, está reflejando de hecho, la presencia de una intensa lesión, de un intenso efecto térmico que provoca esa “artefactual fusión” de EPR a los fotorreceptores, y que indirectamente nos está confirmando la eficacia referida para esta longitud de onda para la adhesión coriorretiniana.

Estas supuestas diferencias en la intensidad y la localización de las alteraciones en la retina externa, creemos que se deben a la metodología utilizada para la descripción de la lesión, de forma que las alteraciones observadas en la zona intermedia descrita en nuestro trabajo, coincidirían más con las descritas para la zona central en los estudios en que sólo distinguen centro y periferia.

La absorción de la energía asociada al rayo láser por parte de la melanina de las células del EPR y coroides y su posterior transformación en calor, provocaría el efecto térmico responsable de las alteraciones de la retina externa y la coroides como señalan algunos autores (MCHUGH, 1995; VAN DER ZYPEN, 1986).

Estamos de acuerdo con trabajos previos (McHUGH, 1988, 1990, 1995; TRIVIÑO 1995; VAN DER ZYPEN 1986) en que la gran intensidad de los daños que nosotros describimos en esta zona intermedia, que presenta una elevada desorganización retiniana superior a la observada en la zona central, y las intensas alteraciones de la retina más interna, anteriormente discutidas, no son explicables únicamente por el efecto térmico coagulativo provocado por la conducción de calor desde la zona central donde ha ocurrido la absorción de energía hasta las adyacentes. En nuestra opinión, debe de haber algún efecto indirecto o secundario, responsable de la intensidad de las alteraciones descritas. Pensamos en la existencia de un efecto “termomecánico”, es decir la elevación de la temperatura ha provocado la evaporación de los líquidos presentes en el interior celular; se ha creado una especie de “burbuja” que se origina en el EPR donde ocurre la absorción y cuya superficie se desplaza de forma concéntrica como una onda, alterando de forma más intensa el anillo de la zona inmediatamente adyacente al impacto central, es decir: la retina externa de la zona intermedia y las capas retinianas internas de la zona central. Este efecto disruptor mecánico superpuesto al fotocoagulativo térmico, ya había sido descrito por Van der Zypen en su trabajo donde comparaba los efectos provocados por la misma cantidad de energía emitida por el láser de diodo Nd:YAG con dos modos diferentes: en modo continuo o con un pico de unos 15-20mseg al principio donde se concentraba aproximadamente el 20% de la cantidad total de la energía emitida. Era pues, con este modo de emisión “no continuo” cuando observaba un notable edema con gran alteración celular en las capas más internas de la retina, mientras que con el modo continuo sólo describía una ligera vacuolización en la CFNO (VAN DER ZYPEN, 1990). En nuestra opinión, la importante pigmentación del animal de experimentación, con una gran cantidad de melanina, que se localiza con mayor densidad en las células pigmentarias del epitelio retiniano, pueden influir en que la mayor absorción de la energía se realice en esa zona, el aumento de la temperatura es tan importante, que a pesar de que no sea rápido, se logre la conversión de fluidos a vapor de agua, creándose una onda disruptora celular a medida que se expande.

En el trabajo de Humphrey (HUMPHREY, 1993), a las 24 horas, se describía la presencia entre los fotorreceptores, de células de aspecto globoso y pigmentadas al igual que nosotros a los 3 días, además de observar la presencia de pigmento extracelular. Igualmente, coincidimos con dicho autor, en que a medida que avanza la evolución en el tiempo de la lesión, es notable la presencia de

células pigmentadas de discutible origen. Además de estas células redondeadas con y sin pigmento, también hemos destacado la presencia de células con proyecciones o pseudópodos, tipo ameboide. El tipo y origen de estas células será discutido ya que podría tratarse de células epiteliales desprendidas del EPR, pueden proceder de la coroides que han alcanzado la retina, debido a la afectación de la MB, pueden ser proliferativas de la división de células epiteliales pigmentadas o ser proliferativas de células residentes en la retina y que por fagocitosis se han cargado de pigmento. Este origen no lo podemos discernir con la tinción de hematoxilina-eosina, siendo necesario para su discusión la utilización de técnicas inmunohistoquímicas, como posteriormente comentaremos.

Coroides

A nivel coroideo, observamos una hiperplasia celular, con edema lo que provoca un aumento en el grosor de esta capa en la zona fotocoagulada en comparación con las zonas no tratadas y alteraciones pigmentarias importantes. La capa más afectada es la coriocapilar coincidiendo con otros autores (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988, 1989; LANZETTA, 2005; McHUGH, 1988, 1990; MENCHINI, 1992; SATO, 1992; VAN DER ZYPEN, 1990; WALLOW, 1991) en la existencia de oclusión de los vasos de menor calibre. Los desórdenes pigmentarios también son generalmente descritos por la bibliografía previa (BENNER, 1992; BRANCATO 1989; McHUGH, 1990; MENCHINI, 1992). Es notable una proliferación celular en la zona central, en algunos casos con células de morfología redondeada de aspecto similar a las encontradas en la retina externa (WALLOW, 1991), y otras de aspecto alargado parece que provienen desde la zona periférica, menos afectada, hacia la zona central con una afectación mayor.

La intensidad de las alteraciones coroideas disminuye considerablemente a medida que nos acercamos a la supracoroides donde en ocasiones son todavía patentes los desórdenes pigmentarios (OBANA, 1992) y en algunos trabajos sólo son descritos cuando se utilizan cantidades de energía significativamente superiores (BENNER, 1992; VAN DER ZYPEN, 1990; WALLOW, 1991). Pensamos que la extensión de las alteraciones coroideas viene determinada básicamente por el efecto térmico coagulativo irradiado desde el EPR y no tanto por la absorción de energía en los melanocitos coroideos (BRANCATO, 1988). Sin embargo, las alteraciones coroideas no han resultado tan intensas como ha ocurrido con zonas retinianas situadas a la misma distancia de la zona primaria de absorción de la energía y que explicamos por un mecanismo disruptor termomecánico. Pensamos que, la presencia de vascularización en estas capas, provoca una disminución en la elevación de la temperatura, debido a fenómenos de convección del calor por los vasos sanguíneos, dificultando la conversión de los fluidos en vapor. Además, el tejido coroideo presenta más fibras de colágeno, es decir es menos acuoso que el tejido retiniano y por tanto se dificulta la formación de la “burbuja” de vapor responsable del efecto termomecánico disruptor que en nuestra opinión, determina las intensas alteraciones de la retina interna.

Hemorragias

En algunas de nuestras preparaciones, se han observado la presencia de hematíes en el interior de la retina. Teniendo en cuenta que la retina del conejo es avascular fuera de la zona de los radios medulares, los hematíes que han alcanzado la retina deben entonces proceder de los capilares coroides, intensamente afectados y además atravesar la membrana de Bruch, que por tanto debe presentar discontinuidades. Por el mismo mecanismo, esta alteración vascular no sólo es responsable de hemorragias sino también del aumento del edema en las capas retinianas más externas favorecido por el movimiento de fluido desde la coroides hacia el espacio subretiniano (McHUGH, 1988). De hecho, en nuestras preparaciones, la rotura de membrana de Bruch es patente, observación señalada por otros autores en trabajos publicados (BALLES 1990b; SMIDDY, 1992a; VAN DER ZYPEN, 1986, 1990). Este hecho además explicaría que células de similar morfología se hayan detectado tanto en la coroides como en la retina externa; tanto si se trata de células epiteliales que migran de la retina a la coroides o fibroblastos en sentido contrario, e incluso de macrófagos (WALLOW, 1991), es necesaria que la membrana de Bruch pierda su continuidad.

Parece ser que las elevadas temperaturas afectan el colágeno (TRIVIÑO, 1997). Esta alteración del colágeno de la membrana y del epitelio apical ha sido descrita en estudios ultraestructurales de microscopia electrónica de transmisión, en algunos casos con afectación de los elementos elásticos y rotura (VAN DER ZYPEN, 1990) y en otros donde, sin embargo se mantiene la continuidad de la membrana de Bruch (LANZETTA, 2005; McHUGH, 1995; WALLOW, 1991).

La aparición de hemorragias es un efecto indeseable de la fotocoagulación, por lo que el estudio de su presencia o ausencia siempre ha sido contemplado y comparado en los estudios de fotocoagulación con láser. Sin embargo su descripción en la bibliografía es muy dispar y depende de muchos factores. Si la presencia de hemorragias estuviera únicamente determinada por el hecho de utilizar una longitud de onda infrarroja que implica que mayor cantidad de energía alcanza la coroides y lesiona significativamente los vasos allí presentes, los resultados obtenidos y la bibliografía previa confirmaría este aspecto. En este sentido, hay trabajos que confirman esta hipótesis en los que la frecuencia de hemorragias es superior con el diodo que con otros láseres (BALLES, 1990b; OBANA, 1992) recomendando disminuir potencias y aumentar los tiempos de exposición cuando se utilice la longitud de onda infrarrojo. Sin embargo, hay trabajos donde con irradiaciones similares a la nuestra no describen la aparición de hemorragias (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988, 1989; DUKER, 1989; WALLOW, 1991), otros en que describen que las alteraciones del EPR y la frecuencia de hemorragias son menores con el láser de diodo que con el láser de argón (SATO, 1992), o incluso artículos en que (McHUGH, 1988) a pesar de asumir que la penetración es más profunda con las longitudes de onda larga del diodo en comparación con las del argón verde o kriptón rojo, y que además mostraron significativamente más daño coroidal con implicación de elementos coroides más profundos y mayor edema difuso, no aprecia diferencias entre las lesiones en la retina producidas por el diodo o el kriptón y diferencias muy leves con las del argón. Esta gran variabilidad

de resultados nos lleva a pensar en que la presencia de hemorragia está más determinada por las características del tejido diana, que por las características de la emisión de láser utilizada, como se postula en un estudio comparativo realizado en primates (ZUCLICH, 1992) entre diferentes longitudes de onda y diferentes modos de emisión. La pigmentación de la coroides varía mucho de una zona a otra en el mismo globo ocular y también entre individuos (OBANA, 1992) y en nuestra opinión explicaría la gran diversidad de resultados obtenidos en nuestro estudio señalado igualmente por la bibliografía previa.

La presencia de hemorragias intrarretinianas en retinas vasculares como la humana, está indirectamente relacionado con la aparición del síndrome vitreo-retiniano proliferativo, (ALGVERE, 1990; SATO, 1992; TSO, 1977), debido, como explica algunos trabajos, a la liberación de moléculas plasmáticas responsables de la proliferación glial (DE JUAN, 1988; PURO, 1990, 1991). La proliferación glial y vascular que forman la cicatriz glial en respuesta a una lesión es la causante de la formación de membranas epirretinianas, efecto postfotocoagulativo secundario indeseable y muy frecuente en algunas patologías (ALGVERE, 1990; CAMPOCHIARO, 1968; GOLDARACENA, 1992; LAQUA, 1975; NILLER, 1986; NORK, 1987; OHIRA, 1990; SEO, 2000; VAN HORN, 1977). En otros trabajos, piensan que no son las hemorragias intrarretinianas ni la rotura de la Bruch las responsables de la formación de membranas, sino que se debe a factores de crecimiento que estimulan la proliferación glial, sintetizados y liberados por las células del EPR (BRYAN, 1986; PURO, 1991; ROWENS, 1985). En nuestros resultados obtenidos a los tres días postfotocoagulación, no hemos observado ningún indicio de dicho síndrome en la superficie vitreo-retiniana de nuestras preparaciones, a pesar de que la alteración de la MLI, barrera separadora entre retina y vítreo, es significativa.

Periferia

La zona periférica al estar más alejada de la zona del impacto y por tanto de absorción de energía, presenta progresivamente desde el centro hasta el borde una recuperación de la citoarquitectura retiniana entendida como una disminución de la intensidad de las alteraciones descritas coincidiendo con otros autores (BRANCATO, 1988). Las dos últimas áreas más tardías en recuperarse son las capas retinianas más externas, es decir desde el EPR hasta la CNE y la retina más interna, MLI, CFNO y CCG. En el primer caso, resulta lógico pensar que la zona externa de la periferia es la más cercana al lugar de máxima absorción de energía y por tanto con alteraciones más intensas que tardan en recuperarse. Sin embargo, en el caso de las capas más internas, que por tanto son las más alejadas de la superficie de absorción, resulta interesante que se recuperen tan lentamente. Pensamos que la explicación estriba en que los daños ocurridos en el tejido nervioso adyacente de la zona central le afectan ya que en el caso de la CFNO las fibras nerviosas están dispuestas paralelamente y en perpendicularidad con el haz luminoso, mientras que en el caso de las células bipolares o fotorreceptores de las capas más externas están dispuestas paralelas al rayo incidente.

Por ello, la afectación de las fibras nerviosas a nivel de la CFNO de la zona central, secundariamente afecta a las zonas periféricas, siendo por tanto más lenta su recuperación.

Radios medulares

Con respecto a los impactos sobre la zona de los radios medulares, serían de esperar similares resultados a los obtenidos en el resto de las zonas de la retina que hayan sido tratadas, ya que como hemos comentado, ni la mielina que rodean las fibras nerviosas, ni la hemoglobina en el interior de los vasos sanguíneos deberían de tener ningún efecto, teniendo en cuenta sus características de absorción para la longitud de onda del infrarrojo cercano que estamos utilizando. Sin embargo, es necesario destacar, que en algunas preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina hemos destacado un significativo adelgazamiento de las fibras nerviosas e incluso podríamos comentar un sensible aumento de la intensidad de las lesiones de las capas retinianas subyacentes. La explicación de este hecho no resulta sencilla, tal vez podríamos pensar en que la glía de Müller que sustenta y da un soporte a estas fibras nerviosas y el resto de elementos celulares que forman la retina, haya sido tan intensamente dañada que hayan perdido por completo esta función.

5.5.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

- Con PGFA:

En nuestros resultados, hemos obtenido marcaje inmunopositivo frente a la PGFA a los 3 días postofotocoagulación en la zona más interna de la retina, entre la MLI y la CPI. En las zonas adyacentes a la lesión, directamente no irradiadas (Fig. 11), este marcaje disperso se concreta más claramente en unas células que localizan su cuerpo celular PGFA (+) en la CNI y dirigen sus proyecciones también PGFA (+) hacia la CPE, CPI e incluso CCG. Por la morfología, situación de su cuerpo celular y prolongaciones, junto al marcaje inmunopositivo frente a la PGFA, podrían ser consideradas como astroglia. El hecho de que en las zonas directamente afectadas por el impacto, estas células no puedan observarse nitidamente a los tres días postofotocoagulación, sino que haya un marcaje disperso, puede ser un indicador del intenso daño celular que ha afectado a las células incluso, a niveles tan internos de la retina.

En el área directamente lesionada por la irradiación, destaca es un hipermarcaje en la MLI en forma de acúmulo invadiendo el vítreo, observación que coincide con el trabajo de Ramírez y col (RAMÍREZ, 2001) en ojos humanos con degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Pensamos que se podría tratar, de forma similar a las retinas con DMAE de una membrana glial, compuesta por las prolongaciones de la glía de Müller que forman la MLI y astrocitos hipertróficos, ambos presentando un marcaje PGFA (+). Este hipermarcaje también se observa en la CFNO, paralelo a los axones de las células ganglionares.

Este hipermarcaje señalado en otros trabajos (HERNÁNDEZ, 2000; MORGAN, 2000; TRIVIÑO, 1996; RAMÍREZ 2001) puede ser explicado como consecuencia de la hipertrofia celular de los astrocitos “reactivos”, característica de la cicatriz glial que aparece en tejidos oculares patológicos (RAMÍREZ, 2001; WOLTER, 1955b). Además de la hipertrofia celular, para Hernández y col. otras características de la cicatriz glial son, la proliferación glial y vascular y el aumento en la expresión de PGFA en las células gliales (HERNÁNDEZ, 2000). Tanto la hipertrofia y el aumento de la expresión de PGFA en astrocitos, así como su proliferación, pueden ser responsables, en conjunto o por separado, del aumento en la intensidad del marcaje frente a PGFA que destacamos en la zonas del impacto de nuestros resultados. Ahora bien, la implicación de estos astrocitos “reactivos” en los procesos de conservación y recuperación de lesiones es un aspecto controvertido, ya que, según algunos autores, los astrocitos “reactivos” protegen a las neuronas (RAMÍREZ, 2001) y pueden favorecer la regeneración axonal (RIDET, 1997), en opinión de otros (HERNÁNDEZ, 2000), son estos astrocitos reactivos, los responsables de la degeneración axonal, impidiendo la regeneración neural.

Si tenemos en cuenta la anatomía de la retina del conejo, avascular y por tanto con escasos astrositos fuera de los radios medulares, única zona vascularizada y con grandes haces nerviosos mielinizados, es de esperar que si hay una gliosis, hipertrofia astrocitaria y aumento de marcaje, será en esta zona donde se vea más patente. De hecho, el marcaje inmunopositivo en esta área cuando ha sido fotocoagulada es mucho mas intenso, marcando claramente los márgenes de la fibras nerviosas, en la MLI y el límite de la CPI paralelo a las capas retinianas y también destacando las proyecciones que envuelven los haces nerviosos y que entonces aparecen en una disposición más perpendicular a las capas retinianas.

El otro elemento glial objeto de estudio con la PGFA sería la glía de Müller, ya que se conoce por numerosos estudios que la glía de Müller, PGFA (-) en retinas normales, puede presentar un marcaje PGFA (+) como respuesta a diversas lesiones (BIGNAMI, 1979; SCHERER, 1991; SHAW, 1984).

Aunque ultraestructuralmente, Schnitzer en retinas de monos normales, destacó la presencia de filamentos intermedios formados de vimentina y PGFA en la glía de Müller, esta estirpe macroglial aparece PGFA (-) en los trabajos inmunohistoquímicos derretían. Sin embargo, son numerosos los trabajos que destacan en retina la reacción de la glía de Müller en respuesta a diferentes patologías, traumas o simplemente envejecimiento celular, mediante un cambio en la inmunorreactividad frente a la PGFA, pasando de ser PGFA (-) a mostrar un inmunomarcaje PGFA (+) (HUMPHREY, 1993; SCHERER, 1991).

Coincidimos con trabajos similares de estudio de la respuesta glial tras la fotocoagulación retiniana, (HUMPHREY, 1993, 1997; TASSIGNON, 1991) en el hecho de que en la zona del impacto, en los estadios tempranos postfotocoagulación, que abarcan hasta los 4 días, no se detecte un claro marcaje inmunopositivo de las células de Müller, a excepción de la posible contribución al

hipermarcaje de la MLI discutido anteriormente. Como los autores, pensamos que posiblemente se debe al hecho de que en la zona directamente afectada por el impacto, el daño celular ha sido tan intenso, que la expresión de cualquier proteína está retrasada, y después de tres días tras la lesión, los mecanismos reparadores celulares no están completamente activados.

Esta explicación se confirma, cuando en las zonas adyacentes a la lesión, pero no directamente afectadas por la irradiación, aparecen unas prolongaciones PGFA (+) que corren perpendicularmente a las capas retinianas, y se localizan entre la MLI donde toman un aspecto en cepillo, hasta aproximadamente la CNI donde el marcaje inmunopositivo se pierde. Este marcaje coincide con la morfología y localización de la glía de Müller, al menos parcialmente de su zona más interna. Esta estirpe microglial sitúa su cuerpo celular en la CNI, desde el que parten dos procesos principales. Uno se dirige hacia el borde interno de la retina, formando parte de la MLI y el otro se extiende hacia la retina externa, formando la MLE donde proyecta microvellosidades. Procesos secundarios más finos rodean las membranas celulares de las neuronas en todas las capas retinianas.

El hecho de observar marcaje inmunopositivo frente a PGFA en la glía de Müller adyacente, ha sido previamente descrito en otros trabajos (HUMPHREY, 1993, 1997; TASSIGNON, 1991). Es decir debe existir una comunicación entre las células de la lesión y las zonas adyacentes que provoca una respuesta química en la glía de Müller procediendo a la síntesis de PGFA, que en situaciones normales no se expresa. La explicación podría encontrarse en las uniones intercelulares, ya sea bien o entre elementos neuronales y glía. La observación de que fundamentalmente se marque la zona más interna de la glía de Müller de las zonas no alterando, puede estar confirmando esta comunicación, ya conocida, entre la glía de Müller y los axones de las células ganglionares que corren paralelamente a la superficie retiniana. Igualmente las células dañadas pueden liberar al medio extracelular factores de liberación relacionados con el daño celular o la inflamación que desencadenen la respuesta glial de las zonas adyacentes (HUMPHREY, 1993).

En este sentido los resultados obtenidos por Humphrey (HUMPHREY 1993) en montajes planos de retinas de conejos fotocoagulados con láser de argón, describía el área de afectación de la glía de Müller a las 24 horas superior al área directamente afectada por el impacto. En su opinión, la afectación y extensión de la glía de Müller está directamente relacionada con el área de EPR afectado, lugar primario de la absorción de la energía.

- Con lectinas:

Con excepción de los numerosos trabajos con técnicas argentínicas de tinción del Del Río-Hortega, no son muchos los trabajos en los que utilizando técnicas inmunohistoquímicas, se describe la respuesta microglial retiniana frente a una lesión o trauma a corto plazo. Además, la mayoría de estos trabajos basan la descripción de la respuesta microglial en cambios en la intensidad y distribución del marcaje en montajes planos de retina, generalmente tras lesiones en el NO

(SCHNITZER, 1990; THANOS, 1992), por lo que la discusión y comparación de los resultados debe de ser especialmente cuidadosa.

Aún teniendo en cuenta estas salvedades, hay aspectos relevantes y característicos que deben ser comentados. Coincidimos con las observaciones de Schnitzer en que tanto la morfología como la distribución de la microglía retiniana varían como respuesta a una lesión ocular (SCHNITZER 1990). Así, nuestras observaciones revelan un marcaje lectina positivo que se extiende mucho más allá de la CPI y capas adyacentes, donde era casi únicamente observable en las áreas retinianas no tratadas. Este intenso marcaje, que dificulta la individualización de las células marcadas con lectinas que se localizan entre la CPI y las capas más externas de la retina, podría tener distintas explicaciones:

- Podría tratarse de un artefacto de la técnica o el resultado de un marcaje menos selectivo debido a la gran alteración celular existente en esta zona. De hecho, en alguna preparación donde se ha podido individualizar alguna célula marcada con lectina en la CNE, se observa que el marcaje de sus prolongaciones aparece intermitente y discontinuo, reflejando el intenso nivel de la alteración celular sufrida.
- Podría deberse a un cambio en la distribución de la microglía, como señala Schnitzer (SCHNITZER, 1990) en montajes planos de retinas con marcaje con NDPasa. Es decir, la microglía situada en la CPI, que en situaciones normales tiene forma estrellada y se localiza en dos estratos dentro de la CPI (SCHNITZER, 1989) pero distribuida de forma uniforme, tras la lesión se distribuye en un número mayor de estratos, solapándose sus prolongaciones que además aparecen engrosadas; lo que en conjunto provocan el aumento en la intensidad del marcaje, notable a los 4 días tras la lesión del NO. Aunque la distribución en estratos no se puede confirmar en nuestro trabajo, pensamos que es concretamente el hecho de un engrosamiento y solapamiento de proyecciones, lo que provoca una intensidad tan alta en el marcaje, y de hecho es esa elevada intensidad del marcaje lo que impide la individualización celular y la observación de los estratos.
- Otra explicación discutida en el mismo trabajo (SCHNITZER, 1990) se dirige hacia una proliferación microglial, de forma que al aumentar el número de células y éstas mostrar un marcaje, aumentará por tanto la intensidad del marcaje observado. En nuestras preparaciones, al tratarse de secciones transversales y al ser casi imposible individualizar las células marcadas, no se puede realizar su conteo y por tanto no podemos asegurar que se deba a una proliferación.

Por otro lado, en nuestros resultados destacamos la presencia de células ganglionares que presentan marcaje lectina positivo en la superficie de su cuerpo celular, a diferencia de la distribución paralela a los axones, que se observa en las retinas no patológicas. Este hecho podría deberse a un cambio en la expresión de los marcadores de superficie de estas células que, mientras en situaciones normales son lectina negativos, se convertirían en lectina positivos tras la lesión fotocoagulativa; de forma similar a como le ocurre a la glía de Müller con la PGFA. Sin embargo,

teniendo en cuenta que las lectinas se unen a residuos azucarados de la superficie celular, somos partidarios de pensar que lo que ocurre, es que las prolongaciones microgliales lectina positivas alcanzan este nivel y proceden a rodear a estas células ganglionares, como se ha señalado en otros trabajos (SCHNITZER, 1990). Puede que el objetivo sea el de proteger a las células ganglionares, aislándolas de un entorno, que posiblemente contenga un alto contenido en factores tóxicos o inflamatorios.

En relación con las células inmunorreactivas de morfología globosa o redondeada con pigmento en su interior formando gránulos, descritas en el espacio entre el EPR y las capas retinianas desprendidas podríamos decir que se tratan de células del EPR proliferante que expresan en su superficie sustratos a los que se unen las lectinas o que se trate de células de origen microglial y que por tanto son lectina positivos. La morfología globosa, no estrellada, se debe a la adquisición de un papel fagocítico, que la hace perder su aspecto estrellado y que la confiere un aspecto redondeado debido al material fagocitado. De igual forma, pueden aparecer cargadas de pigmento. Esta función fagocítica, limpiadora de fluidos y desechos celulares es una de las principales de las células microgliales. Teniendo en cuenta que estamos en tiempos cortos tras la lesión, se puede pensar que el primer paso de cualquier recuperación tisular sería la limpieza de la zona de desechos producto de la alteración y muerte celular que ha ocurrido.

En cuanto al hecho de observar un marcaje más notable en la zona de los segmentos externos de los fotorreceptores en comparación con las zonas no tratadas donde también se observa un inmunomarcaje, pero de menor intensidad; posiblemente se trate de un artefacto y de la baja especificidad del marcaje por lectinas de otros elementos o restos celulares que se concentran en esta zona tras la lesión. El marcaje con marcadores microgliales ya ha sido señalado previamente; SCHNITZER (1990) señalaba un débil marcaje con NDPasa rodeando a los segmentos externos de los fotorreceptores. En su opinión, teniendo en cuenta la ausencia de microglía a este nivel, concluía que se trataba del marcaje sobre la NDPasa de las fibras de la glía de Müller que se encuentran a este nivel; ya que la NDPasa de la glía de Müller y de la microglía son similares.

5.6.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A MEDIO PLAZO (7 Y 15 DÍAS)

5.6.1.- HEMATOXILINA EOSINA

El aspecto global de la lesión ha variado considerablemente en comparación con la lesión a los 3 días. La división del área afectada en tres zonas ya carece de sentido, diríamos que sólo se puede hablar de una zona central y una periferia (BRANCATO, 1988; WALLON, 1991) y se puede observar una continuidad entre retina y coroides, una adhesión de las capas nucleares con el EPR (PULIAFITO, 1987; SMIDDY, 1992a) a los 15 días, con la desaparición de la capa que correspondería a los segmentos externos de los fotorreceptores.

Es también notable que la extensión de la lesión en el EPR es mayor que la del diámetro del impacto, debido a la conducción del calor generado justo en el centro de la lesión, propagándose a los alrededores los efectos coagulativos térmicos. En opinión de Humphrey (HUMPHREY, 1993) el pico de dispersión de la reacción ocurre entre 7-14 días. Luego ya se estabiliza, pero incluso en los estadios más tardíos de evolución, la lesión del EPR supera la superficie del diámetro del spot utilizado.

En sólo cuatro días, la aparente recuperación morfológica de las capas más internas de la retina es notable. Aunque permanece un ligero grado de edema y desestructuración celular, el área desde la MLI hasta la CPI se encuentra relativamente conservada, coincidiendo con la bibliografía previa de descripción histológica (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; SMIDDY, 1992a; WALLOW, 1991).

Es de destacar la remodelación de las capas más externas de la retina, donde los cambios estructurales y morfológicos son patentes (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; SATO, 1992; SMIDDY, 1992a,b; WALLOW, 1991). Estos importantes cambios remodelan, no recuperan la citoarquitectura retiniana de estas capas y posiblemente son debidos a que los daños provocados en esta zona resultaron irreversibles, sin posibilidad de recuperación, ya que el daño fotocoagulativo implicó la muerte de la mayoría de los elementos celulares que se situaban en este nivel (WALLOW, 1991). Ya señalamos la presencia de gran cantidad de desechos y pigmento extracelular que es necesario pues retirar cuanto antes. Por ello, coincidimos en la descripción de la lesión a los 8, 10 o 15 días y 3 semanas de evolución que hacen otros autores (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; HUMPHREY, 1993; WALLOW, 1991) y que señalan la presencia de grandes células hiperpigmentadas, en la retina más externa, sustituyendo a los necróticos fotorreceptores descritos inmediatamente hasta 3 días postfotocoagulación. Estas células globosas aumentan su tamaño y su contenido de pigmento intracelular a medida que pasa el tiempo. Así mismo, tienden a agruparse, como en racimos o multicapas, estructura también descrita previamente (BENNER, 1992; HUMPHREY, 1993), que podría considerarse como una incipiente cicatriz coriorretiniana a nivel del EPR y coroides más externa (PULIAFITO, 1987; SMIDDY, 1992b; WALLOW, 1991).

En nuestros resultados además describimos la presencia de otra morfología celular más alargada, menos globosa, sin pigmento y con la presencia de proyecciones o pseudópodos. Estos dos tipos celulares morfológicamente diferenciables, podrían tratarse de diferentes estirpes celulares totalmente diferentes en morfología, origen y fisiología, o en caso contrario, ser la misma estirpe celular, pero en distinto estadio; o incluso diferentes estirpes en diferentes estadios.

Se podría tratar de células proliferantes epiteliales (BENNER, 1992; DUKER, 1989) que proceden del EPR, células gliales (BENNER, 1992), fibroblastos o macrófagos (BENNER, 1992; WALLOW, 1991) descritos en la coroides y que por tanto pueden provenir de ella, lo que explicaría la presencia de pseudópodos necesarios para su desplazamiento. Estos elementos celulares con material extracelular de aspecto fibroso, formaría una especie de tapón intentando mantener una continuidad

entre retina y coroides, base histológica de la adhesión coriorretiniana característica de las zonas fotocoaguladas.

Alguna de las estirpes celulares referidas o varias de ellas, con una morfología ameboides o irregular, al alcanzar la zona más necrótica, con mayores desechos celulares, podrían desarrollar una necesaria función fagocítica e ir adquiriendo tanto desechos celulares como pigmento extracelular procedente de las células del EPR y de los melanocitos coroides alterados. Una vez cargadas de pigmento, presentarían un aspecto diferente al original, serían entonces células más redondeadas o globosas, hiperpigmentadas y con movimientos más limitados.

Si verdaderamente son la misma estirpe celular en diferentes momentos, como está descrito para la microglía en estado residente y activa, deberían poseer características inmunohistoquímicas comunes, mientras que si se tratara de dos estirpes celulares diferentes, con distinto origen y distinta función, carecerían de esta característica común. Intentaremos discutir sobre ellos utilizando técnicas de marcaje inmunohistoquímico.

Las células globosas, con pigmento en su interior son observables a otros niveles más internos de la retina (BENNER, 1992). En algunas preparaciones, tanto de la zona central como periférica, aparecen incluso de manera aislada en la MLI, es decir en la superficie vítreo-retiniana. Si estas células provienen de la vascularización coroidea, han atravesado la discontinua membrana de Bruch y han alcanzado la superficie vítrea, podríamos encontrarnos en el comienzo de uno de los efectos secundarios indeseables post-fotocoagulativos, que sería la formación de membranas vítreo-retinianas.

La coroides continua edematosa e hiper celular, manteniéndose la oclusión vascular sobre todo de los vasos de menor calibre de la coriocapilar, coincidiendo con trabajos previos que describen esta zona. (BENNER, 1992; WALLOW, 1991).

5.6.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

- Con PGFA:

En nuestros resultados a los 7 y 15 días observamos marcaje PGFA inmunopositivo en la zona del impacto que corresponde con la glía de Müller, coincidiendo con trabajos inmunohistoquímicos previos en retinas de conejos fotocoaguladas (TASSIGNON, 1991). Las zonas más marcadas corresponden a su parte más interna desde la CNI hasta la MLI y su terminación más externa, la que formaría la MLE. Teniendo en cuenta, que la zona entre la CNE y EPR que incluye MLE y segmentos externos de los fotorreceptores es la más intensamente alterada, podemos decir que el extremo externo de la glía de Müller forma parte de esa cicatriz glial, constituida por ese tejido fibrocelular a modo de tapón, constituyendo su borde externo o limiante.

La glía de Müller de las áreas de la retina más alla del centro de la lesión y sus bordes, muestran escasa o nula inmunopositividad frente a la PGFA a las dos semanas, coincidiendo con trabajos previos en conejos (TASSIGNON, 1991). Similar resultado fue descrito cuando se trataba de lesiones fotocoagulativas aisladas en la retina de ratas (HUMPHREY, 1993, 1997). Sin embargo, es de destacar que cuando el número de impactos en el mismo área de la retina murina era elevado, la glía de Müller de las áreas retinianas no dañadas directamente por la radiación y situada entre varias lesiones continuaba hiperreactiva frente a la PGFA hasta los 21 días postofotocoagulación. Esto nos indica que la extensión y la duración de la hiperreactividad de la glía de Müller, morfológicamente sin alteraciones, está relacionada con el número de lesiones en el mismo area, más que por el grado de intensidad de lesiones aisladas.

- Con lectinas:

En una descripción general de la lesión, se observa un aumento de la inmunopositividad por lectinas a medida que aumenta el tiempo tras la lesión. Puede deberse a un aumento de las células marcadas que procedan de zonas adyacentes; porque las células inmunopositivas residentes hayan proliferado o porque el marcaje sea más inespecífico y por tanto aparezca en más elementos celulares que en un primer momento no aparecía.

Coincidiendo con SCHNITZER (1990) en su estudio con NDPase en montajes planos, en nuestras observaciones, es también notable un aumento de la intensidad del marcaje en la zona de la CPI a la semana y dos semanas de la fotolesión. Este aspecto ha sido ya ampliamente discutido anteriormente, destacando que en nuestro estudio, con cortes transversales, sin conteo celular ni detección de mitosis, no podemos concluir que se deba a una verdadera proliferación glial. Podría también ocurrir que más que una verdadera proliferación, se trate de un desplazamiento de la microglía de los alrededores de la lesión, hacia el interior de ésta con intención de colaborar en las tareas de limpieza de desechos celulares y recuperación del área lesionada. Esto implicaría una disminución en el número de células de las zonas adyacentes, disminución que si la hubiese no ha sido cuantificada. Lo que sí es patente es el cambio de morfología, también ya señalado anteriormente, entre las zonas no tratadas donde la microglia aparece con un cuerpo celular pequeño y muy ramificada y la zona tratada, donde su individualización es mucho más compleja, con un marcaje más generalizado, con cuerpos celulares más grandes y globosos y ramificaciones más engrosadas.

En estas lesiones a medio plazo, destaca que la inmunopositividad frente a lectinas principalmente se sitúa entre la CPI y MLI; coincidiendo igualmente con SCHNITZER (1990) en la distribución de estas células, quien únicamente señalaba algunas células dispersas en la CPE a medio plazo tras la lesión, de forma similar a como lo había hecho a corto plazo.

Como ocurría en la descripción de la lesión a los días, siguen apareciendo esas células globosas inmunopositivas; a los 7 y 15 días la mayoría de ellas cargadas de pigmento; lo que refleja el incremento de su actividad fagocítica. Además; la situación de estas células se desplaza hacia el interior a medida que aumenta el tiempo tras la lesión; de hecho a los 15 días estas células globosas se pueden observar en la CCG, CFNO e incluso sobre la MLI. Se podría pensar que son células microgliales que se observan fundamentalmente en la CPI en las zonas no tratadas y que ante la lesión se vuelven reactivas, con características fagocíticas y comienzan su migración hacia el interior. Sin embargo, teniendo en cuenta que estas células globosas a los 3 días se observaban cercanas al EPR pueden indicar que su origen es epitelial o de la coroides vascularizada subyacente. Lo que sin duda parece es que estas células se van desplazando desde el exterior retiniano hacia el interior limpiando todo lo que encuentran a su paso; aumentando por tanto el volumen de su cuerpo celular, la disminución de sus prolongaciones y la cantidad de pigmento acumulado en su interior. En el espacio que abandonan en su viaje hacia el interior de la retina, aparece un tejido de aspecto fibroso que delimita la lesión por su lado más externo. En este tejido, sobre todo en su limitante externa se observan de nuevo células inmunopositivas con una morfología más típica de microglía; cuerpo celular pequeño y prolongaciones.

5.7.- EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN A LARGO PLAZO (1 Y 2 MESES)

5.7.1.- HEMATOXILINA EOSINA

Aunque los cambios más significativos en la evolución de la lesión, ocurren en las dos primeras semanas tras la exposición al láser, discutidas en su evolución a corto y medio plazo, los efectos que observamos al mes y dos meses consolidan aquellos procesos y mecanismos que describíamos como incipientes en estadios precoces y consolidan las características histopatológicas de la lesión coriorretiniana (McHUGH, 1990).

Tanto a los 30 como a los 60 días, la recuperación de las capas más internas de la retina que describíamos como una disminución del edema y alteraciones estructurales a los 15 días, se ha detenido o avanzado muy poco (HUMPHREY, 1993). La vacuolización e hipertrofia de las células ganglionares; así como el edema de la CFNO y desestructuración de la MLI no parece haber disminuido en comparación con la lesión a las dos semanas. Es decir, parece como si la recuperación de los daños reversibles (WALLOW, 1991) ya hubiera finalizado y la progresión de los daños irreversibles, que fundamentalmente implican muerte celular o daño axonal, progresara con otro mecanismo reparador diferente y más complejo, necesitando posiblemente la participación de otros elementos celulares ajenos a los constituyentes de las propias capas de la retina interna. Por ello, en la CCG además de las hipertróficas células ganglionares, aparecen otras células de diferente morfología, que alcanzan incluso la superficie de la MLI. Esta membrana fibrocelular sobre la MLI, procedente desde la coroides, ya ha sido descrita previamente (BENNER, 1992) tras 30 días postfotocoagulación no sólo con el láser de diodo, sino también en las lesiones provocadas con el láser de argón verde o kriptón rojo.

Coincidimos con Humphrey (HUMPHREY, 1993) en que la superficie de EPR afectada es siempre mayor que la zona directamente afectada por el impacto incluso al mes y medio tras la fotocoagulación. Esto se debe al efecto, ya referido, de dispersión del calor generado justo en el centro de la lesión donde ocurrió la primera y principal absorción de la energía asociada al rayo y que, además es la responsable de la mayor intensidad de los efectos tanto en el EPR como fundamentalmente en la retina externa más allá de los límites del diámetro del impacto utilizado.

De igual forma, teniendo en cuenta que las alteraciones y daños celulares de la retina más externa eran mucho más intensos, los elementos celulares y la muerte de esto más frecuente, las alteraciones de la retina más externa y EPR permanecen más estables en el tiempo.

En nuestros resultados, tanto a los 30 días como a los dos meses, destaca la presencia de un tejido que ocupa la retina más externa que ocupa aproximadamente el espacio entre la CNI y coroides. Este tejido que describíamos como laxo en los tiempos a medio plazo de 1-2 semanas se ha ido haciendo más denso con el paso del tiempo y a medida que nos acercamos al EPR. Por lo tanto ese tapón fibroso incipiente descrito a la semana, se convierte en un tejido formado por elementos celulares y sus prolongaciones, material extracelular fibroso y presencia de desechos celulares y pigmento, y es a partir del mes y fundamentalmente de los dos meses cuando podemos hablar de una estable adhesión coriorretiniana, frecuentemente señalada por la bibliografía previa (BENNER, 1992; BRANCATO, 1988; McHUGH, 1995; MENCHINI, 1992; SMIDDY 1992b; WALLOW, 1991), con un tejido cicatricial pigmentado que muestra una continuidad entre las capas externas de la retina y coroides atravesando la membrana de Bruch. Algún trabajo incluso comenta como característica (SMIDDY, 1992b) que, a los dos meses, la cicatriz pigmentada de adhesión coriorretiniana provocada por la fotocoagulación con diodo, era más profunda y más parecida a la formada por la criopexia, que las que se formaban con el argón verde o el kriptón rojo.

Los tipos celulares presentes en este tejido cicatricial, presentan morfologías diferentes. Hay unas células de relativamente pequeño tamaño con núcleo irregular, de forma triangular o en otros casos, más bien alargado y otras células de mayor tamaño, globosas, con núcleo grande y redondeado y que pueden aparecer sin pigmento o con diferente cantidad de pigmento en su interior. Para McHugh (McHUGH, 1990) que asume una continuidad de la membrana de Bruch, las células no pigmentadas, se trata de células epiteliales proliferativas, mientras que las pigmentadas, opinión con la que coincidimos, se trata de células del EPR que se han desprendido de la membrana de Bruch y que aparecen en la retina externa y también de macrófagos fagocíticos cargados de pigmento. Esta descripción coincidiría con la distribución de estas estirpes celulares en la retina. Así las células globosas que tienen pigmento y que se localizan en las cercanías del EPR agrupadas en una o varias capas (BRANCATO, 1988; TRIVIÑO, 1995; WALLOW, 1991), se trataría fundamentalmente de células epiteliales proliferativas desprendidas de la membrana de Bruch, sin crear uniones estrechas entre ellas (McHUGH, 1990). Este autor también las sitúa con o sin pigmento, pero de

forma más aislada a otros niveles de la retina, incluso en capa más internas. En nuestra opinión, es difícil discernir si son células epiteliales proliferantes o macrófagos que han fagocitado tanto células epiteliales pigmentadas irreversiblemente alteradas, como pigmento extracelular, provenientes de la coroides, ya que en nuestro trabajo asumimos que existen discontinuidades de la membrana de Bruch. Por otro lado, en cuanto al origen y procedencia de las células más pequeñas con núcleo irregular, podemos especular sobre la posibilidad de que se trate de células microgliales que ayudan a la limpieza procedentes de la CPI o de las células procedentes de la coroides.

La confirmación de existencia de adhesión coriorretiniana es una característica deseable para su uso terapéutico, pero indirectamente estamos asumiendo la rotura de la membrana de Bruch y por tanto la rotura de la BHR, aunque en el trabajo en humanos de McHugh tanto con MO como MET confirma la continuidad de la Bruch (McHUGH, 1990). Este hecho, junto a las alteraciones vasculares, incluso provocando hemorragias, ya discutidas en los resultados a los tres días, nos lleva a pensar en la posibilidad de que elementos sanguíneos alcancen la retina y puedan estar implicados en la creación de membranas vitreo-retino proliferativo. Sin embargo, en opinión de algunos autores (BRANCATO, 1988; MENCHINI, 1992; SATO, 1992), el láser de diodo provoca una escasa reacción estructural en la superficie vitreo-retiniana, un menor deterioro del EPR y una mayor extensión en la trombosis coriocapilar que la fotocoagulación con otros láseres, lo que disminuye la creación de membranas epirretinianas indeseables.

Coincidimos con otros trabajos en los que se describe la recanalización de vasos coriocapilares, incluso parcial de vasos de mayor calibre (BENNER, 1992) y una notable disminución del edema (McHUGH, 1990). También coincidimos con trabajos previos en la descripción de cambios morfológicos en los melanocitos coroides, patentes por los desórdenes pigmentarios que describimos en nuestros resultados, en los que destacamos el aspecto más globular de los melanocitos coroides o tal vez macrófagos en la zona más central de la retina y el aspecto más alargado, similar al de la retina ilesa en la zona más periférica de la lesión ((McHUGH, 1990; MENCHINI, 1992)

5.7.2.- INMUNOHISTOQUÍMICA

- PGFA

Nuestros resultados con inmunohistoquímica frente a la PGFA, confirman resultados descritos en los estudios previos. La glía de Müller, tanto al mes como a los dos meses postfotocoagulación, sigue apareciendo PGFA (+) en las lesiones retinianas (HUMPHREY, 1993, 1997; TASSIGNON, 1991) y no en las zonas adyacentes y alejadas del mismo como ocurría para tiempos de evolución más cortos, alrededor de los 7 días. El marcaje de la glía de Müller se limita casi por completo al centro de la lesión donde resulta más notable en las terminaciones gliales que ocupan las capas más internas MLI, CFNO y CCG y en su terminación más externa, es decir, donde se situaba la MLE.

Este hipermarcaje en la zona más externa, que también destaca en las áreas irradiadas de los radios medulares, ya no es tan patente en el extremo más interno, donde para tiempos más cortos a la hipermarcaje de los astrositos alterados se añadía el marcaje de glía de Müller, siendo por tanto, a este nivel interno, mucho más intenso que en la zonas no fotocoaguladas. Estos nos hace pensar, que la hiperreactividad astrocitaria, la de la parte más interna de la glía de Müller o ambas, ha disminuido notablemente con el paso del tiempo.

De igual forma, la extensión de la afectación glial también decrece con el tiempo, tal y como ya señaló Humphrey (HUMPHREY, 1997) en sus montajes planos, mientras que para tiempos de evolución cortos y medios de hasta 2 semanas, la extensión de la alteración de la glía de Müller supera ampliamente la superficie de EPR afectada; a partir de las dos semanas, la afectación de la glía de Müller va disminuyendo progresivamente, de forma que al mes y medio es menor que la superficie de EPR afectada, coincidiendo casi con el centro de la lesión determinada por el diámetro del impacto y zona primaria de absorción de energía.

- Lectinas:

La mayor intensidad del marcaje con lectinas en la zona del impacto se sitúa fundamentalmente en la CPI; coincidiendo con las observaciones de Schitzer (SCHNITZER, 1990) que utilizaba el marcaje con NDPasa. De hecho, mientras en las zonas no lesionadas, el marcaje de esta capa se observa en las células microgliales con cuerpo celular pequeño y sus tortuosas prolongaciones; en la zona del impacto el marcaje es tan intenso y difuminado que la individualización celular no es posible. Schitzer asume una mayor densidad celular biestratificada que se mantiene hasta los 5 meses postratamiento, donde la densidad celular de la CPI lesionada es igual a la de los controles.

De forma similar ocurre con las células globosas inmunopositivas, que nosotros observamos tanto en la CPI, así como en las capas adyacentes desde CPI hasta MLI, observaciones ya señaladas por otros trabajos previos (HUMPHREY, 1996). Sin embargo, en otros trabajos con tiempos más largos, como Schnitzer a los dos meses postratamiento, no las describen (SCHNITZER, 1990).

5.8.- VISIÓN GENERAL DE LA EVOLUCIÓN DE LA LESIÓN

A los 3 días postfotocoagulación, la intensidad de las alteraciones celulares en prácticamente todas las capas retinianas es muy elevada, como nos revela las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. De hecho, para describirlas mejor ha resultado útil la diferenciación de tres zonas: central, intermedia y periférica como han hecho otros autores. En la zona denominada intermedia destaca la gran intensidad de las alteraciones de la retina externa, desde la CPI hasta el EPR. Ya a los tres días, se empiezan a ver unas células de aspecto ameboide, con pseudópodos y otras células más redondas y que pueden estar o no cargadas de pigmento que parecen proceder de la zona del EPR y membrana de Bruch; por el hecho de encontrarse en esta zona apenas tres días tras la

fotocoagulación. Las células ameboides podrían proceder de la coroides, la presencia de pseudópodos hace pensar que están migrando posiblemente desde los vasos coroides. Podría tratarse de células fagocíticas, que debido a las alteraciones vasculares, ya que la fotocoagulación puede causar hemorragias, y a la rotura de la membrana de Bruch, por la alteración coagulativa de las fibras de colágeno; salen de los dañados vasos coroides y migran hacia el interior retiniano.

Pensamos, que el aumento de la intensidad de marcaje con lectinas, podría significar que a las células microgliales residentes lectinas positivas y que están presentes en situaciones normales y visibles en las zonas no tratadas normalmente en la CPI y sus alrededores, se añade el marcaje proporcionado por otras células nuevas de la misma familia, ya que comparten el mismo marcaje inmunohistoquímico, que proceden de las áreas adyacentes no dañadas o por una proliferación celular. Desgraciadamente, el intenso grado de alteración de esta zona, permite únicamente describir un aumento de intensidad de marcaje, pero apenas permite individualizar los tipos celulares o poder discernir entre ambas posibilidades.

Otra explicación para el intenso marcaje con la lectinas, podría ser que se tratara de células epiteliales, que proceden del EPR, que se han desprendido de él, por las alteraciones de la Bruch y hayan proliferado, adquiriendo entonces una función fagocítica, resultando con características similares a macrófagos por lo que aparecen lectina positivas.

Con respecto al marcaje PGFA, destaca un aumento de fibras en la MLI y CFNO; este aumento del marcaje es más destacado en la zona de los radios medulares. En nuestra opinión, podría tratarse de células astrogliales que acompañan a las fibras nerviosas. Estas células gliales y los axones que rodean están alterados y edematosos; por lo que el marcaje es más intenso. Por otro lado, además podría superponerse el marcaje de las proyecciones en cepillo de la glía de Müller. Aunque la glía de Müller es PGFA negativa, se sabe que se hace PGFA positiva en situaciones traumáticas o patológicas. En las zonas periféricas y adyacentes al área fotocoagulada, donde el grado de lesión es menor, se puede observar la alteración que sufre la glía de Müller y también se pueden individualizar astrocitos PGFA (+) con su morfología estrellada clásica a nivel de la CCG y CPI.

Estas células lectinas positivas ameboides y fagocíticas, que a los 3 días aparecen de forma dispersas de la retina externa, a medida que pasa el tiempo empiezan a formar una especie de tejido “tapón” limitando los elementos celulares neuronales de la retina de las células epiteliales del EPR y la coroides. Por ello a los 7 días, este tejido “tapón” pasa de ser laxo con espacios intercelulares y vacuolización celular a ser un tejido más denso, donde siguen apareciendo las estirpes celulares anteriormente mencionadas cada vez más frecuentemente pigmentadas, así como pigmento extracelular.

Cada vez es más notable la presencia de células globosas pigmentadas lectina (+). Estas células presentan marcaje en sus proyecciones, que son bastante cortas o casi inexistentes en función de si

están total o parcialmente llenas de pigmento. Principalmente se encuentran localizadas en las inmediaciones del EP, pero también aparecen en otras localizaciones retinianas más internas, a medida que pasa el tiempo tras la fotocoagulación. Podría tratarse de células encargadas de limpiar toda la retina de desechos y pigmento extracelular. Estas células globosas son PGFA negativas, sin embargo son lectina positivas, lo que confirma la facultad fagocítica que poseen. El marcaje con lectinas es igualmente más intenso en la CPI, localización usual de las células microgliales.

También destaca la presencia de células de pequeño tamaño, con prolongaciones marcadas, que se encuentran en la zona del tapón. Estas células podrían estar migrando desde la CC, ya que la Bruch sigue apareciendo discontinua y la continuidad entre el tejido retiniano y corioideo es notable.

Las alteraciones de pigmentación en la coroides son notables, siendo notable la ausencia de pigmento en la CC

A medida que pasa el tiempo, el marcaje PGFA positivo se hace cada vez más intenso. A los 7 y 15 días se empieza a ver marcada la glía de Müller en la zona del impacto tanto en su extremo interno, en la MLI así como en el externo, la MLE. De hecho, algunos elementos celulares del tapón de la retina externa aparecen PGFA (+), y podrían ser las proyecciones más externas de la glía de Müller. El marcaje inmunopositivo frente a la PGFA en la CFNO es más intenso en la zona de los radios medulares, ya que allí el marcaje de la glía de Müller se añade al que presentan los astrocitos. El marcaje inmunohistoquímico con lectinas, utilizado para localizar las células microgliales, es notablemente más intenso en la zona tratada en comparación con la no tratada, tras 1 y 2 semanas después de la fotocoagulación; sin embargo no resulta posible la individualización de estas células como ocurre en la CPI y capas adyacentes en las zonas no lesionadas. Este hecho se puede interpretar tanto como que las lectinas se han unido de forma más inespecífica a los desechos celulares que se encuentran en casi toda la retina poco tiempo tras la lesión; como que realmente hay una mayor densidad de células microgliales por proliferación de la microglía residente o por migración de las zonas adyacentes no dañada a la zona lesionada para contribuir a las labores de limpieza.

La mayor densidad celular es notable a los 15 días en las zonas más internas de la retina, donde se observan células morfológicamente distintas a las células que se encuentran en dichas capas retinianas, incluso en la zona de los radios medulares. Desde la CNI hasta el EPR, el tejido “tapón” cada vez aparece más denso conteniendo las células ameboides y las globosas cargadas de pigmento que aunque son menores en número, son mayores en tamaño, porque han fagocitado la mayoría del pigmento extracelular. De hecho, el pigmento extracelular casi ha desaparecido a los 15 días postfotocoagulación.

Las alteraciones pigmentarias de la coroides son notables. El pigmento procedente de la CC donde hay una disminución pigmentaria notable y el de las dañadas células del EPR está siendo fagocitado

por las células de aspecto globoso que se convierten en hiperpigmentadas. Por otro lado en la supracoroides hay acúmulos de pigmento, como si también a este nivel se hubieran activado células fagocíticas que limpian la coroides y que de forma similar a la del tapón retiniano se localizan también en la supracoroides. Mientras que, en la mayoría de las preparaciones, como consecuencia de su manejo en el laboratorio se producía una desunión a nivel del EPR, a los 15 días en algunas preparaciones observamos que la desunión no afecta a las zonas del impacto, es decir es como si en la zona del impacto la retina estuviera más firmemente adherida a la coroides mediante ese tejido continuo que atraviesa el EPR.

A más largo plazo, es decir al mes y dos meses postfotocoagulación, persiste la alteración de las capas más internas, donde es todavía patente la proliferación celular, pero la intensidad de la lesión parece estar disminuida en comparación con las obtenidas a los 3, 7 y 15 días. Es notable la recuperación de la citoarquitectura retiniana observada a los dos meses. El tejido tapón de la zona externa persiste y es más denso en la zona más externa y cercana al EPR formando una solución de continuidad con la coroides, con migración celular desde la coroides hasta la retina de forma que algunos tipos celulares se encuentran tanto en la CC como en la retina. En mi opinión, se confirma la adhesión coriorretiniana que empezó a ser patente a los 15 días. Las células que forman ese tejido son las ya comentadas, las de aspecto globoso generalmente cargadas de pigmento y las de aspecto ameboide. Estos tipos celulares son lectinas positivos; es decir células micrigniales o a menos con función fagocítica. Las células cargadas de pigmento tienden a situarse en el borde externo del tapón, es decir como formando otro epitelio pigmentario que limite la lesión, este hecho es especialmente patente a los dos meses.

La intensa alteración que ha sufrido la glía de Müller sigue siendo patente ya que continúa apareciendo PGFA (+) en sus extremos interno y externo retiniano de la lesión. Asimismo, la alteración de la Müller es patente en la zona de los radios medulares.

En resumen, la energía asociada al rayo es absorbida en el EPR, donde se convierte en calor y se crea el efecto coagulativo. Este efecto se irradia desde esa zona primaria de absorción hacia la retina interna y coroides. A medida que pasa el tiempo, se va recuperando la citoarquitectura retiniana desde las zonas internas a las externas y desde la periferia hacia el centro, Por tanto el tiempo disminuye el área de afectación. En la zona externa de la retina más intensamente afectada, hay una clara proliferación celular, posiblemente proveniente de la coroides y que forma un tejido de tapón, que provoca una adhesión coriorretiniana patente a los 15 días. Este tejido tapón está formado por diversas estirpes morfológicamente diferentes, pero todas ellas reactivas frente al marcaje con lectinas, lo que nos indica un carácter fagocitario. Las células fagocíticas limpian la retina de desechos celulares incluido el pigmento extracelular que proviene de las células del EPR afectadas y de la coriocapilar y que a los dos meses se suelen localizar en el borde más externo del tapón, simulando un nuevo EPR.

El marcaje inmunohistoquímico con PGFA nos ha permitido confirmar que la alteración glial es clara. Por un lado, los astrocitos que en situaciones normales son PGFA (+), en las zonas del impacto aparecen más intensamente reactivos. Por otro lado, en cuanto a la glía de Müller, nos ha permitido confirmar su intensa afectación, observándola PGFA (+) en alguno de sus trayectos. Es de destacar que la glía de Müller adyacente a la zona del impacto también resulta afectada, fundamentalmente en los tiempos postfotocoagulación más cortos.

La inmunohistoquímica con lectinas nos confirma la presencia de células microgliales lectina (+) alrededor de la CPI en las zonas no tratadas, que proliferan o se afectan ya que aumenta la intensidad del marcaje en las zonas del impacto. También nos ha mostrado la existencia de proliferación celular con células de características fagocíticas que migran aparentemente desde la coroides y que parecen tener una función limpiadora.

6.- CONCLUSIONES

1.- La fotocoagulación con el láser de diodo a los parámetros utilizados produce una lesión en el fondo ocular del conejo pigmentado que alcanza todas las capas de la retina y la coroides hasta los vasos de mediano calibre.

2.- Las lesiones principales observadas se localizan en la retina externa y coroides; por lo que se confirma que el pigmento responsable de la absorción de la energía lumínica es la melanina presente en las células del epitelio pigmentario de la retina y los melanocitos coroides.

3.- Los hallazgos tisulares observados corresponden fundamentalmente a los descritos como de tipo térmico, debidos a la transformación de la energía absorbida en calor que se transmite desde el EPR hacia la retina interna y coroides.

4.- Los efectos fotocoagulativos térmicos más intensos se observan en el centro de la lesión, lugar de la absorción, y van disminuyendo en intensidad hacia la periferia de la lesión.

5.- Al efecto térmico coagulativo se añade un efecto termomecánico en las zonas intermedias de la lesión. Estas alteraciones termomecánicas, producidas por el rápido incremento de la temperatura y la consiguiente evaporación de fluidos, son más disruptoras y persistentes que las térmicas coagulativas.

6.- Las células neuronales y epiteliales de la retina presentan alteraciones de grado variable, hipertrofia y vacuolización hasta muerte celular. Las alteraciones celulares menos intensas, que no implican muerte celular, son reversibles con el paso del tiempo.

7.- Las células astrogiales presentan en toda la zona de la lesión un estado reactivo, con aumento del marcaje inmunohistoquímico para PGFA. La glía de Müller, en cambio, está afectada y presenta inmunopositividad anómala para PGFA tanto en la zona de la lesión como en el área no directamente afectada de su entorno.

8.- Se observa un incremento progresivo, durante 2 meses, de la microglía proliferante, reactiva y fagocitaria, en toda la lesión. Su origen vascular o local no se ha podido establecer con las tinciones realizadas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. ABBOTT N.J. (1987): Glia and the blood-brain barrier. *Nature*, 325: 195
2. ACARIN L., VELA J.M., GONZÁLEZ B., CASTELLANO B. (1994): Demonstration of poly-N-acetyl lactosamina residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *Journal of Histochem. And Cytochem.*, 42, 8: 1033-1041
3. ACARIN L., GONZÁLEZ B., CASTELLANO B., CASTRO A.J. (1996): Microglial response to N-methyl-D-aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. *Journal of Comp. Neurol.*, 367:361-374.
4. ACARIN L., GONZÁLEZ B., CASTRO A.J., CASTELLANO B. (1998): Glial response to excitotoxic injury in the immature rat brain. En: *Understanding glial cells.* (Castellano B., González B., Nieto-Sampedro M Eds.); págs.: 271-295 Kluwer Academic Publisher.
5. ACHÚCARRO N. (1908): Sur la formation de cellules à batonnet (Stäbchenzellen) et d'autre éléments similaires dans le système nerveux central. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. madrid*, 6: 97-123.
6. ACHÚCARRO N. (1909): Cellules allongées et stäbchenzellen, cellules néurogliales et cellules granulo-adipeuses á la corne d'amon du lapin. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 7: 201-215
7. ACHÚCARRO N. (1910): Algunos datos relativos a la naturaleza de las células en bastoncillo de la corteza cerebral humana obtenidos con el método de Cajal. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 8: 169-176
8. ACHÚCARRO N. (1911): Neuroglía y elementos intersticiales patológicos del cerebro impregandolos por los métodos de reducción de a plata o por sus modificaciones. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*, 9: 161-179.
9. ACHÚCARRO N. (1913): Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia y en particular de la neuroglia de la corteza cerebral humana. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 11: 187-217
10. ACHÚCARRO N. (1915): De l'evolution de la néuroglie, et spécialement de ses relations avec láppareil vasculaire. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 8: 169-176
11. ALGVERE P.V., HALLNÄS K., DAFGARD E., HÖOG A. (1990): Panretinal photocoagulation aggravates experimental vitreoretinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthal.* 228: 461-466.
12. ALGVERE P.V., TORSTENSSON P.L., TENGROTH B.M. (1993): Light Transmittance of ocular media in living rabbit eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34:349-354
13. ALLT G., LAWRENSON J.G. (1997): Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Research Reviews* 13: 169-212
14. ÁLVAREZ M.P., SOLAS M.T., SUAREZ I., FERNÁNDEZ B. (1989): Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in cat satellite cells of sympathetic ganglia. *Acta Anatomica.*, 136: 9-11
15. AMY R.L., STORB R. (1965): Selective mitochondrial damage by a ruby laser microbeam. An electron microscopic study. *Science*. 150: 756-758.
16. ANDRÉS M.V. (1993): Alteraciones retinianas en conejos pigmentados tras la aplicación por láser teñido (tesina)
17. ANSELL P.L., MARSHALL J. (1976): Laser induced phagocytosis in the pigment epithelium of the hunter dystrophic rat. *Brit. J. Ophthalmol.* 60: 819-828.
18. ASHWELL K. (1989): Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 287: 286-301.
19. BALLE M.W., PULIAFITO C.A. (1990a): Semiconductor diode laser: a new light source in ophthalmology". *Int. Ophthalmol. Clin.* 30:77-83
20. BALLE M.W., PULIAFITO C.A. D'AMICO D.J., JACOBSON J.J., BIRNGRUBER R (1990b): "Semiconductor diode laser photocoagulation in retinal vascular disease. *Ophtalmology* 97:1553-1561
21. BARÓN M., GALLEGÓ A. (1972): The raltion of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 128: 42-57.
22. BASS M.S., PERKINS E.S., UHEELER C.B. (1977): Experimental results with a pulsed dye laser. *Adv. Ophthalmol.* 34: 164-168.
23. BenEZRA D., CHAN C.C. (1987): S-100 antigenic determinants in human retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 225: 151-153
24. BENNER J.D., HUANG M., MORSE L.S., HJELMELAND L.M., LANDERS M.B. (1992):

- Comparison of photocoagulation with the argon, krypton, and diode laser indirect ophthalmoscopes in rabbit eyes. *Ophthalmology* 99(10): 1554-1563
25. BERGER U.V., TSUKAGUCHI H., HEDIGER M.A (1998): Distribution of mRNA for the facilitated urea transporter UT3 in the rat nervous system. *Anat. Embryol (Berlin)*. 197: 405-414.
 26. BERGQUIST T., KLEMAN B., TENGROTH B. (1965): Laser irradiance levels for retinal lesions. *Acta Ophthalmol.* 43: 331
 27. BERWALD-NETTER Y., KOULAKOFF A., NOWAK L., ASCHER P. (1986): Iones channels in glial cells. En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.) Vol. 2: Biochemistry, physiology, and pharmacology of astrocytes; págs: 51-75. Academic Press INC, Orlando, USA
 28. BIGNAMI A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA C.T. (1972): Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research*, 43: 429-435
 29. BIGNAMI A., DAHL D. (1977): Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25: 466-469
 30. BIGNAMI A., DAHL D. (1979): The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury: An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp. Eye. Res.*, 28: 63-69.
 31. BJÖRKLUND H., DAHL D., OLSON L., SEIGER A (1984a): Glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity in the iris: development, distribution, and reactive changes following transplantation. *Journal of Neuroscience*, 4: 978-988.
 32. BJÖRKLUND H., DAHL D., SEIGER A. (1984b): Neurofilament and glial fibrillary acidic protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. *Neuroscience*, 12: 277-287.
 33. BJÖRKLUND H., BIGNAMI A., DAHL D. (1985a): Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Müller glia and retinal astrocytes. *Neuroscience Letters*, 54: 363-368.
 34. BJÖRKLUND H., DAHL D. (1985b): Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the rodent eye. Comparison between peripheral glia of the anterior uvea and central glia of the retina. *Journal of Neuroimmunology*, 8: 331-345
 35. BLAIR C.J., GASS J.D.M. (1972): Photocoagulation of the macula and papillo-macular bundle in the human. *Arch. Ophthalmol.* 88: 167-171.
 36. BLOMSTRAND C., HAMBERGER A. (1970): Amino acid incorporation in vitro into protein of neuronal and glial cell-enriched fractions. *Journal of Neurochemistry*, 17: 1187-1195.
 37. BOETTNER E.A., WOLTER J.R. (1962): Transmission of the ocular media. *Invest. Ophthalmol.* 1: 776-783.
 38. BOOTH P.L. (1991): Evidence for motility and pinocytosis in ramified microglia in tissue culture. *Brain.Res.*, 548: 163-171
 39. BOPP S., EL-SAYED E.H., LAQUA H. (1994): The photoreceptor cells and retinal pigment epithelium of normal and diseased human retinas express different glycoconjugates. *German J. Ophthalmol.*, 3: 27-36.
 40. BORGES J.M., CHARLES H.C., LEE C.M., SMITH R.T., CUNHA-VAZ J.G., GOLDBERG M.F., TSO M.O.M. (1987): "A clinicopathologic study of dye laser photocoagulation on primate retina". *Retina*, 7: 46-57.
 41. BORWEIN B., SANWALL M., MEDEIROS J.R., GOWAN J.W. (1977): "Scanning electron microscopy of normal and laser rabbit pigment epithelium". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 700-710.
 42. BOWBYES J.A., HAMILTON A.M., BIRD A.C. (1973): "The argon laser, the effect on retinal tissues and its clinical applications". *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* 93: 439-453.
 43. BOYA J. (1975): Contribution to the ultrastructural study of microglia in the cerebral study. *Acta anat.*, 92: 364-375.
 44. BOYA J. (1976): An ultrastructural study of the relationship between pericytes and cerebral macrophages. *Acta anat.*, 95: 598-608.
 45. BOYA J., CALVO J., PRADO A. (1979): The origin of microglial cells. *J. Anat.*, 129: 177-186.
 46. BOYA J., CALVO J., CARBONELL J.L., GARCÍA-MAURINO E. (1986): Nature of macrophages in rat brain. A histochemical study. *Acta Anat.*, 127: 142-145.
 47. BOYA J., CALVO J., CARBONELL A.L. (1987a): Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch. Histol. Jpn.*, 50: 223-228.
 48. BOYA J., BORREGÓN A., CARBONELL A.L., CALVO J. (1987b): Estudio bioquímico e inmunohistoquímico de los macrófagos cerebrales. *Histología Médica III*: 153-158.
 49. BOYA J., CARBONELL A.L., CALVO J., BORREGÓN A. (1987c): Ultrastructural study on the

- origin of rat microglia cells. *Acta Anat.*, 130: 329-335.
50. BOYA J., CALVO J.L., CARBONELL A.L., BORREGÓN A. (1991a): A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J. Anat.* 175: 229-236.
 51. BOYA J., CARBONELL A.L., CALVO J.L., BORREGÓN A. (1991b): Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: Cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat.*, 140: 250-253.
 52. BOYCOTT B.B., HOPKINS J.M. (1981): Microglia in the retina of monkey and other mammals, its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience*, 6: 679-688
 53. BRANCATO R., PRATESI R. (1987a): Applications of diode lasers in ophthalmology. *Laser Light Ophthalmol* 1(3): 119-129.
 54. BRANCATO R., LEONI G., TRABUCCHI G., TRABUCCI E. (1987b): Transcleral contact cyclophotocoagulation with Nd: YAG laser CW: experimental study on rabbit eyes. *Int. J. Tissue React.* 9 (6): 493-498
 55. BRANCATO R., PRATESI R., LEONI G., TRABUCCHI G., GIOVANNONI L., NANNI U. (1988): Retinal photocoagulation with diode laser operating from a slit lamp microscope. *Laser Light Ophthalmol.* 2(1):73-78
 56. BRANCATO R., PRATESI R., LEONI G., TRABUCCHI G., VANNI U. (1989): Histopathology of diode and argon laser lesions in rabbit retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 1504-1510.
 57. BREW H., GRAY P.T.A., MOBS P., ATTWELL D. (1986): Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature*, 324: 466-468.
 58. BREW H., ATTWELL D. (1987): Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of retinal glial cells. *Nature*, 327: 707-709.
 59. BRIGHTHAN H.W., REESE T.S. (1969): Junctions between intimate and apposed cell membranes in the vertebrate brain. *Journal Cell Biology*, 40: 648-677.
 60. BRODERICK C., DUNCAN L., TAYLOR N., DICK A.D. (2000): IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 41, 9: 2613-2622
 61. BÜLOW N. (1978): The process of wound healing of the avascular outer layers of the retina. Light and electron microscopic studies on laser lesion of monkey eyes. *Acta Ophthalmol.*, Suppl. 139: 60 págs.
 62. BYRNES V.A., BROWN D.V.L., ROSE H.W., CIBIS P.A. (1956): Chorioretinal lesions due to thermal radiation from the atomic bomb. *Am. J. Ophthalmol.* 55: 909-914.
 63. CALVO J.L., CARBONELL A.L., BOYA J. (1990): Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Research*, 532: 355-357
 64. CAMMERMEYER J. (1970): The life history of the microglial cells: A light microscopic study. Ehrenpreis S. Solnitzky (eds.) *Neuroscience Res*, Academic Press, New York : 43-429.
 65. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., KOESTER C.J. (1963): The optical maser as a retinal coagulator: An evaluation. *Trans. Am. Ophthalmol. Otorinol.* 67: 58-67.
 66. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., KOESTER C.J. (1966a): Photocoagulation of the retina. En: *Laser Photocoagulation* (M. Flocks, Ed.) International Ophthalmology Clinics Vol. 6. Nº2: 293-318. Little, Brown and Company, Boston.
 67. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., NOYORI K.S., SWOPE C.H., KOESTER C.J. (1966b): The threshold of the retina to damage by laser energy. *Arch. Ophthalmol.* 76: 437-442.
 68. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., SWOPE C.H., KOESTER C.J. (1968a): Ocular effects produced by experimental lasers. I.- Q-switched Ruby Laser. *Am. J. Ophthalmol.* 66: 459-470.
 69. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., BREDEMEIER H., WALLACE R.A. (1968b): Ocular effects produced by experimental lasers. II.- Carbon Dioxide Laser. *Am. J. Ophthalmol.* 66: 604-614.
 70. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., INNIS R.E., SHINER W.H. (1968c): Ocular effects produced by experimental lasers. III.- Neodymium Laser. *Am. J. Ophthalmol.* 66: 614-632.
 71. CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., SWOPE C.H., WALLACE R.A. (1969): Ocular effects produced by experimental lasers. IV.- The Argon Laser. *Am. J. Ophthalmol.* 67: 671-681.
 72. CARBONELL A.L., BOYA J., CALVO J.L., MARÍN J.F. (1991): Ultrastructural study of the neuroglial and macrophagic reaction in wallerian degeneration of the adult rat optic nerve. *Histology and Histopathology*, 6: 443-451.
 73. CASTELLANO B., GONZÁLEZ B., FINSEN B.R., ZIMMER J (1990): Histochemical demonstration of purine nucleoside phosphorylase (PNPasa) in microglial and astroglial cells of adult rat brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 38: 1535-1539.
 74. CASTELLANO B., GONZÁLEZ B., JENSEN M.B., PEDERSEN E.B., FINSEN B.R., ZIMMER

- J. (1991a): A double staining technique for simultaneous staining of astrocytes and microglial cells in vibratome brain sections and astroglial cell cultures. *J. Histochem. Cytochem.*, 39: 561-568.
75. CASTELLANO B., GONZÁLEZ B., DALMAU J., VELA J.M. (1991b): Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J. Comp. Neurol.* 311: 434-444.
 76. CHAN-LING T., STONE J. (1992): Degeneration of astrocytes in feline retinopathy of prematurity causes failure of the blood-retinal barrier. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 33: 2148-2159.
 77. CHEN H., CHOPP M., JIANG Q., GARCÍA J.H. (1992): Neuronal damage, glial response and cerebral metabolism after hypothermic forebrain ischemia in the rat. *Acta. Neuropathologica*, 84: 184-189.
 78. CLARKE K., GEISERT E.E. (1998): The target of the antiproliferative antibody (TAPA) in the normal and injured rat retina. *Mol. Vis.*, 10: 43.
 79. CLOVER G.M. (1988): The effects of argon and krypton photocoagulation on the retina: Implications for the inner and outer blood retinal barriers. En: *Laser Photocoagulation of retinal disease*. Cap. 2: 11-18. Ed. Pacific Medical Press. San Francisco, California. USA.
 80. COCCHIA D., PLOAK J.M., TERENCE G., BATAGLIA F., STOLFI V., GANGITANO C., MICHETTI F. (1983): Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. 2., Electrón microscopical immunocytochemistry. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 24: 980-984
 81. COOK R.D., WISNIEWSKI H.M. (1973): The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Brain research*, 61: 191-206.
 82. COSCAS G., SOUBRANE G. (1983): The effects of red krypton and green argon laser on the foveal region. *Amer. Acad. Ophthalmol.* :1013-1022.
 83. CORCÓSTEGUI B., ROMERO P. (1988): Tipos de láser y sus efectos biológicos en el fondo de ojo. En: *Angiografía fluoresceínica y láser* (F. Gómez-Ulla, B. Corcóstegui, Eds.) Cap. 3: 52-64. Universidad de Santiago de Compostela. Sociedad Española de Oftalmología.
 84. CORTÉS E., RUIZ J.M., ZAZURCA J., TEJADA P. (1990): Estudio experimental con láser verde de argón en área macular. *Arch. Soc. esp. Octal.* 58: 319-322
 85. CUFF C.A., BERMAN J.W., BROSNAN C.F. (1996): The ordered array of perivascular macrophages is disrupted by IL-1 induced inflammation in the rabbit retina. *Glia*, 17: 307-316.
 86. DAHL D., BIGNAMI A. (1976): Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. *Brain res.*, 116: 150-157.
 87. DAHL D., BIGNAMI A., WEBER K., OSBORN M (1981): Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100-A filament protein, in normal and reactive astrocytes. *Experimental Neurology*, 73: 496-506
 88. DAHL D., CHI C.H., MILES L.E., NGUYEN B.T., BIGNAMI A. (1982): Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Schwann cells; fact or artifact? *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30: 912-918.
 89. DAHL D., CROSBY C.J., SETH J.S., BIGNAMI A. (1985): Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of Comparative Neurology*, 239: 75-88.
 90. DAHL D., BJÖRKLUND H., BIGNAMI A. (1986): Immunological markers in astrocytes. En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.); Vol III: Cell biology and pathology of astrocytes; págs: 1-19. Academic Press, INC. London.
 91. DAICKER B. (1968): Proliferative und degenerative veränderungen von perivaskulären glia und astroglia der netzhaut. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 153: 697-704
 92. DAMIER P., HIRSCH E.C., ZHANG P., AGID Y., JAVOY-AGID F. (1993): Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience*, 52: 1-6.
 93. DAVISON P.F., WINSLOW (1974): The protein subunit of calf brain neurofilament. *Journal of Neurobiology*, 5: 119-127.
 94. DEL RÍO-HORTEGA P. (1919a): El tercer elemento de los centros nerviosos. I.- La microglía en estado normal. II.- Intervención de la microglía en los procesos patológicos III.- Naturaleza probable de la microglía. *Boletín de la Sociedad Española de Biología*, 8-9: 68-129
 95. DEL RÍO-HORTEGA P. (1919b): Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 15: 367-378.
 96. DEL RÍO-HORTEGA P. (1919c): Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol.*, 9: 154-171.
 97. DEL RÍO-HORTEGA P. (1920): Estudios sobre la neuroglía. La microglía y su transformación

- en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, 18: 37-82.
98. DEL RÍO-HORTEGA P. (1921a): Estudios sobre la neuroglía: La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía). Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural, 21: 63-92.
 99. DEL RÍO-HORTEGA P. (1921b): El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal: éxodo y distribución regional de la microglía. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 11: 213-268.
 100. DEL RÍO-HORTEGA P. (1928): Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 14: 1-122
 101. DEL RÍO-HORTEGA P. (1932): Microglia En: Cytology and celular pathology of the Nervous System. W. Penfield, Ed. Paul B. Hoeber, Inc., New York, Vol. 2: 483-534.
 102. DICK A.D., BRODERICK C., FORRESTER J.V., WRIGHT G.J. (2001): Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina. Invest. Ophthalm. Vis. Sci., 42, 1: 170-176
 103. DIESTLER C., WEIGEL H., HOFFMANN K.P. (1993): Glia cells of the monkey retina. I.-Astrocytes. Journal of Comparative Neurology, 333: 134-147
 104. DUKER J.S., FEDERMAN J.L., SCHUBERT H., TALBOT C. (1989): Semiconductor diode laser endophotocoagulation". Ophthalmic Sur 20(10):717-719
 105. DUSART I., MARTY S., PESCHANSKI M. (1991): Glial changes following and escitotoxic lesion in the CNS. II., Astrocytes. Neuroscience, 45: 541-549.
 106. DYAN A. (1991): Pour la pratique l'astrocyte cerebral. En: Pratique quotidienne en neurologie nº14. Publication médicale des Laboratoires Servier. Artem 27 Ed. Paris
 107. EAGER R.P., EAGER P.R (1966): Glial responses to degenerating cerebellar corticonuclear pathways in the cat. Science, 153: 553-555
 108. ENG L.F., VANDERHAEGHEN J.J. BIGNAMI A., GERSTL B. (1971): An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain res., 28: 351-354.
 109. ERSKINE C.A. (1963): Neuroglial relationships in the human retinal capillary network. British Journal of Ophthalmology, 47: 601-610.
 110. ESQUERDA J.E. (1991): Estrategias generales en los métodos de inmunomarcaje ultraestructural. En: Técnicas de inmunocitoquímica en microscopía electrónica (M. Dufort, S. Vilaró, J. Renau, J. Serratos, Eds.); págs.: 23-32. Publications Universitat de Barcelona. Barcelona.
 111. FAWCETT J.W., ASHER R.A. (1999): The glial scar and central nervous system repair. Brain res. Bull., 49, 6: 377-391.
 112. FLECK B.W., CHEW P.T., LIM A.S., TOCK E.P. (1991): Effects of pulsed Nd-YAG laser on the surface of rabbit retina. Ophthal. Surg. 22: 168-171.
 113. FLOCKS M., ZWENG H.C. (1964): Laser coagulation of ocular tissues. Arch. Ophthalmol. 72: 604-611.
 114. FOLCK J.C., SHORTT S.G., KLEIBER P.D. (1985): Experiments on the absorption of argon and krypton laser by blood. Ophthalmology 92: 100-108.
 115. FRIEDE R.L. (1970): Papel de los pies gliales en el equilibrio electrolítico del cerebro. Triángulo. 9: 165-173.
 116. FRIEDMAN E., KUWABARA T. (1968): The retinal pigment epithelium. IV.- The damaging effects of radiant energy. Arch. Ophthalmol. 80: 265-279.
 117. FRUTTIGER M., CALVER A.R., RICHARDSON W.D. (2000): Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. Curr. Biol., 10: 1283-1286.
 118. GALLEGO A. (1964): Description d'une nouvelle couche cellulaire dans la rétine des mammifères et son rôle fonctionnel possible. Bull. Ass. Anat., 49: 624-631
 119. GALLEGO A. (1976): La microglía de la retina. Comunicación a la Real Academia Nacional de Medicina el día 1 de Junio de 1976. Publicado en el tomo XCIII de los Anales, cuaderno tercero. Madrid.
 120. GALLEGO A. (1986): Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells. Progress in retinal research. /edited by N. Osborne and J. Chader/, Vo. 5, cap. 7: 166-206.
 121. GARGINI C., DEPLANO S., BISTI S., STONE J. (1998): Evidence that the influence of ganglion cell axons on astrocyte morphology is mediated by action spike activity during development. Brain Res. Dev. Brain. Res., 110: 177-184.
 122. GEERAETS W.J., WILLIAMS R.C., CHAN G., HAM W.T., GUERRY D., SCHMIDT F.H. (1960): The loss of light energy in retina and choroid. Arch. Ophthalmol. 64: 606-615.
 123. GEERATS W.J., GUY CHAN R.C.W., HAM W.T., GUERRY D., SCHMIDT F.H. (1962): The

- relative absorption of thermal energy in retina and choroid. *Invest. Ophthalmol.* 1: 340-347.
124. GEERAETS W.J. (1966): Some aspects of laser coagulation. En: *Laser Photocoagulation* (M. Flocks, Ed.) International Clinics Vol. 6. Nº2: 263-274. Little, Brown and Company, Boston. USA.
 125. GEERAETS W.J., BERRY E.R., (1968): Ocular spectral characteristics as related to hazards from laser and other light sources. *Am. J. Ophthalmol.* 66: 15-20
 126. GEHRMANN J., KREUTZBERG G.W. (1991): Characterisation of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia. *J. Comp. Neurol.*, 313: 409-430.
 127. GELLER S.F., LEWIS G.P., ANDERSON D.H., FISHER S.K. (1995): Use of the MIB-1 antibody for detecting proliferating cells in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36: 737-744.
 128. GHANDOUR M.S., LANGLEY O.K., VINCENDON G., GOMBOS G. (1979): Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cells markers. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*, 27: 1634-1637.
 129. GIULIAN D., BAKER T.J., (1985): Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *Journal of Cell Biology*, 101: 2411-2415.
 130. GOLDARACENA M.B., GARCIA A., DE LA FUENTE L.F., PASTOR J.C. (1992): Estudio inmunocitoquímico de las membranas eprirretinianas an un modelo experimental de vitreoretinopatía proliferante (VRP). *Arch. Soc. Esp. Ofal.*, 63: 519-524.
 131. GOLDSTEIN G.W., BETZ A.L. (1986): La barrera hematoencefálica. *Investigación y Ciencia*, 122: 46-55.
 132. GÓMEZ-ULLA F., COSRCÓSTEGUI B. (1988): Angiografía fluoresceínica y laser. 373 págs. LXIV Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. Universidad de Santiago de Compostela.
 133. GUERRY III D., HAM W.T., WIESINGER H., SCHMIDT F.H., WILLIAMS R.C., RUFFIN R.S., SHAFFER M.C. (1956): Experimental production of flash burns in the rabbit retina. *Trans. Amer. Ophthalmol. Soc.* 54: 259-273.
 134. GUERRY IIID., WIESINGER H., HAM W.T. (1958): Photocoagulation of the retina. *Am. J. Ophthalmol.* 46: 463-466
 135. GUERRY III D., WIESINGER H. (1960): Light coagulation. *Am. J. Ophthalmol.* 49: 87-96
 136. HADDAD A., RAMÍREZ A.I., LAICINE E., SALAZAR J.J., TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M. (2001): Immunohistochemistry in association with scanning electron microscopy for hte morphological characterization and location of astrocytes of the rabbit retina. *J. Neuros. Methods*, 106: 131-137.
 137. HAM W.T., WIESINGER H., SCHMIDT F.H., WILLIAMS R.C., RUFFIN R.S., SHAFFER M.C., GUERRY III D. (1958): Flash burns in the rabbit retina. As a means of evaluating the retinal hazard from nuclear weapons. *Am. J. Ophthalmol.* 46: 700-723.
 138. HAM W.T., GEERAETS W.J., MUELLER M.A., WILLIAMS R.C., CLARKE A.M., CLEARY S.F. (1970): Retinal burn threshold for the Helium-Neon laser in the Rhesus monkey. *Arch. Ophthalmol.* 84: 797-809.
 139. HAM W.T., RUFFOLO J.J., MUELLER H.A., GEURRY III D. (1980): The nature of retinal radiation damage: dependence on wavelength, power level and exposure time. II. The quatitative dimensions of intense light damage as obtained from animal studies. *Vision Res.* 20:1105-1111
 140. HAMBERGER A. (1971): Amino acid uptake in neuronal and glial cell fractions from rabbit cerebral cortex. *Brain res.*, 31: 169-178.
 141. HANISCH U-K (2002): Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155
 142. HATFIELD J.S., SKOFF R.P., MAISEL H., ENG L. (1984): Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *Journal of Cell Biology*, 98: 1895-1898.
 143. HAUT J., LIMON S., MASSIN M., PERDRIEL G. (1981): Le laser en Ophtalmologie: 1-97, 175-248. Ed. Masson. Societé Française d'Ophtalmologie.
 144. HERNÁNDEZ M.R. (2000): The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Neuroscion*, 19 :297-321
 145. HERNDON R.M. (1964): The fine structure of the cerebellum II. The stellate neurons, granule cells and glia. *J. Cell. Biol.*, 23: 277-293.
 146. HICKEY W.F., KIMURA H. (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone narrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, 239: 290-292.
 147. HIRSCH S., BAHR M. (1999): Immunocytochemical characterization of reactive optic nerve astrocytes and meningeal cells. *Glia*, 26: 36-46.
 148. HISCOTT P.S., GRIERSON I., TROMBETTA C.J., RAHL H.S., MARSHALL J., McLEOD D.

- (1984): Retinal and epiretinal glia: an immunohistochemical study. *British Journal of Ophthalmol.*, 68: 698-707.
149. HOF L., KIMELBERG H.K. (1985): B-galactosidase in primary cultures of rat astrocytes. Comparison to the brain enzymes. *Journal of Neurochemistry*, 44: 274-277.
 150. HOGAN M.J., FEENEY L. (1963): Ultrastructure of Müller cells and perivascular glia. *Invest. Ophthalmol.*, 2: 101.
 151. HOGAN M.J., ALVARADO J.A., WENDELL J.E. (1971): Histology of the human eye: and atlas and textbook. Págs: 523-606. W.B. Saunders Company Ed. Toronto, Canadá.
 152. HONRUBIA F.M., GRIJALBO M.P. (1970): Estudio de la glia perivascular de la retina. *Archivos de Oftalmología Hispano-Americana*, 30: 197-202.
 153. HUME (1983)?
 154. HUMPHREY M.F., CONSTABLE J.J., CHU Y., WIFFEN S. (1993): A quantitative study of the lateral spread of Müller cell responses to retinal lesions in the rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 334: 545-558.
 155. HUMPHREY M.F., MOORE S.R. (1996): Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and microglial reactions. *Glia*, 16: 325-341.
 156. HUMPHREY M.F., CHU Y., MANN K., RAKOCZY P. (1997): Retinal GFAP and bFGF expression after multiple argon laser photocoagulation injuries assessed by both immunoreactivity and mRNA levels. *Exp. Eye Res.*, 64: 361-369
 157. IGARASHI Y., CHIBA H., UTSUMI H., MIYAJIMA H., ISHIZAKI T., KUWAHARA K., TOBIOKA H., SATOH M., MORI M., SAWADA N. (2000): Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struc. Funct.*, 25: 237-241.
 158. IKUI H., UGA S., KOHNO T. (1976): Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red. *Ophthalmic Res.*, 8: 100-110.
 159. JANZER R.C., RAFF M.C. (1987): Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325: 253-257.
 160. JESSEN K.R., MIRSKY R. (1980): Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286: 736-737.
 161. JESSEN K.R., THORPE R., MIRSKY R. (1984): Molecular identity and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *Journal of Neurocytology*, 13: 187-200.
 162. JOHNSON L.V., HAGEMAN G.S. (1987): Enzymatic characterization of peanut agglutinin-binding component in the retinal interphotoreceptor matrix. *Esp. Eye Res.*, 44: 553-565.
 163. JOHNSON M.W., HASSAN T.S., ELNER V.H. (1995): Laser photocoagulation of the choroids through experimental subretinal hemorrhage. *Arch. Ophthalmol* 113(3):364-370
 164. KARWOSKI C.J., LU H-K., NEWMAN E.A. (1989): Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science*, 244: 578-580.
 165. KASPER M., STOSIEK P. (1990): Detection of GFAP in vertebral fibrocartilage in human fetal and newborn tissue. *Acta Histochemistry*, 88: 25-27.
 166. KATO S., HIRANO A., UMAHARA T., HERZ F., SHIDDA K., MINAGAWA M. (1992): Immunohistochemical studies on the new type of astrocytic inclusions identified in a patient with brain malformation. *Acta Neuropathologica*, 84: 449-452.
 167. KATOH N., PEYMAN G.A. (1988): Effects of various laser wavelengths on the retinal structures En: *Laser Photocoagulation of retinal disease*. Cap. 3: 19-31. Ed. Pacific Medical Press. San Francisco, California. USA.
 168. KAUR C., LING E.A. (1991): Study of the transformation of ameboid microglial cells into microglia labeled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat.*, 142: 118.
 169. KIDWELL T.P., PRIEBE L.A., WELCH A.J. (1976): The measurement of ocular transmittance and irradiation distribution in argon laser irradiated rabbit eyes. *Invest. Ophthalmol.* 15: 668-671.
 170. KIMELBERG H.K., KALTZ D.M. (1985): High-affinity uptake of serotonin into immunochemically identified astrocytes. *Science*, 228: 889-891.
 171. KIMELBERG H.K., NOREMBERG M. (1989): Astrocytes. *Scientific American*, 260: 44-52.
 172. KING J.S. (1968): A light and electron microscopy study of perineural glial cells and processes in the rabbit neocortex. *Anat. Rec.*, 161: 111-124.
 173. KISSEN A.T., DELANEY W.V., WACHTEL J. (1961): The development of chorioretinal lesions produced by photocoagulation. *Am. J. Ophthalmol.* 52: 487-492.
 174. KITAMURA T., MIYAKE T., FUJITA S. (1984): Genesis in resting microglia in the grey matter

- of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 226: 421-433.
175. KOHTIAO A., RESNICK I., NEWTON J. et al. (1966): Temperature rise and photocoagulation of rabbit retinas exposed to the C.W laser. *Am. J. Ophthalmol.* 62: 524
 176. KREUTZBERG G.W. (1968): Über die perineuronale Mikrogliazellen (Autoradiographische Untersuchungen). *Acta Neuropathol. (Berlin)*, suppl., 4: 141-145.
 177. KUFFLER S.W., NICHOLLS J.G. (1976): Physiology of neuroglial cells. En: *From neuron to brain: a cellular approach of the nervous system*; págs: 255-263. Sinaues Associates, INC. Sunderland, Massachussets.
 178. KUMPULAINEN T. (1980): Carbonic anhidrase isoenzyme C in the human retina. An immunohistochemical study. *Archives of Ophthalmol.*, 58: 397-405.
 179. KUMPULAINEN T., DAHL D., KORHONEN L.K., NYSTRÖM H.M. (1983): Immunolabelling of carbonic anhidrase isoenzyme C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina. *Journal Histochem. And Cytochem.*, 31: 879-886.
 180. KUWABARA T., COGAN D.G. (1961): Retinal glycogen. *Archives of Ophthalmology*, 66: 680-688.
 181. KUWABARA T., GORN R.A. (1968): Retinal damage by visible light. *Arch. Ophthalmol.* 79: 69.
 182. KUWABARA T. (1970): Retinal recovery from exposure to light. *Am. J. Ophthalmol.* 70: 187.
 - LANZETTA P., ORTOLANI F., PETRELLI L., CUGINI U., BANDELLO F., MARCHINI M. (2005): Ultrastructural análisis of rabbit retina irradiated with a new 670-nm diode red laser at different powers. *Retina.* 25: 1039-1045
 183. L'ESPERANCE F.A.(1965): The effect of laser radiation on the retinal vasculature. *Arch. Ophthalmol.* 74: 752.
 184. L'ESPERANCE F.A.(1966): Effect of laser radiation on retinal vasculature anomalies. En: *Laser Photocoagulation (M. Flocks, ed.) International Ophthalmology Clinics Vol. 6. N°2: 351-358.* Little, Brown and Company, Bosotr. USA.
 185. L'ESPERANCE F.A.(1968): An ophtalmic argon laser photocoagulation system: design, construction and laboratory investigations. *Trans. Amer. Ophthalmol. Soc.* 66: 827-904.
 186. L'ESPERANCE F.A., KELLY G.R. (1969a): The threshold of the retinal to damage by argon laser radiation. *Arch. Ophthalmol.* 81: 583-588.
 187. L'ESPERANCE F.A. (1969b): The ocular histopathologic effects of krypton and argon laser radiation. *Am. J. Ophthalmol.* 68: 263-273.
 188. L'ESPERANCE F.A. (1971a): Management with photocoagulation. Present status of lasers. *Highlights Ophthalmol.* 13: 331-368.
 189. L'ESPERANCE F.A. (1971b): Argon laser photocoagulation. XXI Concilium Ophthalmol., Mexico 1970. *Acta Excerpta Medica (Amsterdam)* 1: 866-870.
 190. L'ESPERANCE F.A. (1985): Clinical applications of the organic dye laser. *Ophthalmology* 92: 1592-1600.
 191. L'ESPERANCE F.A. (1989a): Historical aspects of ophthalmic laser En: *Ophthalmic lasers (Third Ed.)*. Cap. 1: 13-32. C.V. Mosby Company. St. Louis. USA.
 192. L'ESPERANCE F.A. (1989b): Technical considerations for ocular photocoagulation En: *Ophthalmic lasers (Third Ed.)*. Cap. 4: 78-112. C.V. Mosby Company. St. Louis. USA.
 193. L'ESPERANCE F.A. (1989c): Tunable organic dye laser En: *Ophthalmic lasers (Third Ed.)*. Cap. 9: 249-287. C.V. Mosby Company. St. Louis. USA.
 194. LAKE N. (1992a): Taurine, GABA and GFAP immunoreactivity in the developing and adult rat optic nerve. *Brain res.*, 596: 124-132.
 195. LAKE N. (1992b): Localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve using immunochemical techniques. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 315: 303-307.
 196. LAKE N., VERDONE-SMITCH C., BROWNSTEIN S. (1992c): Immunocytochemical localization of taurine and glial fibrillary acidic protein in human optic nerve. *Visual Neuroscience*, 8: 251-255.
 197. LAM D.M.K., HOLLYFIELD J.G. (1980): Localization of putative amino acid neurotransmitter in the human retina. *Exp. Eye. Res.*, 31: 729-732.
 198. LAPPIN P.W., COOGAN P.S. (1970): Relative sensitivity of various areas of the retina to laser radiation. *Arch. Ophthalmol.* 84: 350-354.
 199. LAQUA H., MACHEMER R. (1975): Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am. Journal Ophthal.*, 80: 602-618.
 200. LAUDER J., MCCARTHY K. (1986): Neuronal-glial interactions. En: *Astrocytes (s. Fedoroff, A. Vernadakis, eds.) Vol II: Biochemistry, phisyology, and pharmacology of astrocytes*; págs:

- 295-315. Academic Press, INC, Orlando, USA.
201. LAZARIDES E. (1980): Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283: 249-256.
 202. LE PRINCE G., COPIN M.C., HARDIN H., BELIN M.F., BOUILLLOUX J.P., TARDY M. (1990): Neuron-glia interactions: effect of serotonin on the astroglial expression of GFAP and of its encoding message. *Develop. Brain Res.*, 51: 295-298.
 203. LEHRMANN E., CHRISTENSEN T., ZIMMER J., DIEMER N.H., FINSEN B. (1997): Microglial an macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Comp. Neurol.*, 386: 461-476.
 204. LEIBOWITZ H.M., PEACOCK G.R., KY F.K., FRIEDMAN E. (1969): The retinal pigment epithelium. Radiation thresholds associated with the Q-switched ruby laser. *Arch. Ophthalmol.* 82: 332-338.
 205. LESSEL S., KUWABARA T. (1963): Retinal neuroglia. *Arch. Ophthal.*, 70: 671-678.
 206. LIEM R.K.H., YEN S.H., SOLOMON G.D., SHELANSKI M.L. (1978): Intermediate filaments in nervous tissues. *Journal of Cell Biology*, 79: 637-645.
 207. LIEM R.K.H., KEITH C.H., LETERRIER J.F., TRENNER E., SHELANSKI M.L. (1981): Chemistry and biology of neuronal and glial intermediate filaments. *Cold Spring harbour Symposia on Quantitative Biology*, 46: 341-350.
 208. LIESI P., SILVER J. (1988): Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS?. *Development Biology*, 130: 774-785.
 209. LIETH E., LANOUE K.F., BERKICH D.A., XU B., RATZ M., TAYLOR C., HUTSON S.M. (2001): Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J. Neurochem.*, 76: 1712-1723.
 210. LIN C.P. (1993): Lasser tissue interactions: basic principles. In: Berlin MS (ed) *Laser in Ohthalmology: An update*, Philadelphia, PA: WN Saunders Co. *Ophtalmol Clin N Am* 6(3): 381-391
 211. LINDSAY R.M. (1986): Reactive gliosis. En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.). Vol III: *Cell biology and pathology of astrocytes*; Págs: 231-262. *Academis Press INC*, Orlando, USA
 212. LING E.A. (1982): A light microscopic demostration of ameboid microglia and microglial cells in the retina of rats of various ages. *Arch. Histol. Jap.*, 45: 37-44.
 213. LOBRINUS J.A., UILLERAT-JEANNERET L., DAREKAR P., SCHLOSSHAVER B., JANZER R.C. (1992): Induction of the blood-brain barrier specific HT7 and neurothelin epitopes in endothelial cells on the chick chorioallantoic vessels by a soluble factor derived from astrocytes. *Developmental Brain Res.*, 70: 207-211.
 214. LÓPEZ-COLOMÉ A.R., ROMO DE VIVAR M. (1991): Excitatory acid receptors in primary cultures of glial cells from the retina. *Glia*, 4: 431-439.
 215. LÓPEZ-ENRÍQUEZ M. (1926): Existencia de células de Hortega "microglía" en la retina y vías ópticas. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.*, XXVI, 5: 1-9.
 216. LÓPEZ-ENRÍQUEZ M. (1927): Las células de Hortega en la retina y vías ópticas en estado normal y patológico. *Arch. Oftal. Hispano-Amer.*, 27: 322-349.
 217. LUDVIGH E., MCCARTHY E.F. (1938): Absorption of visible light by the refractive media of the human eye. *Arch. Ophthalmol.*, 20: 37
 218. MADDOX P.H., TAY S.K., JENKINS D. (1987): A new fixed cryosection technique for the simultaneous immunocytochemical demonstration of T6 and S-100 antigens. *Histochemical Journal*, 19: 35-38.
 219. MAINSTER M.A., SLINNEY D.H., BELCHER C.D., BUZNEY S.M. (1983): Laser photodisruptors. Damage mechanisms instrument design and safety. *Ophthalmology* 90: 973-991
 220. MAINSTER M.A. (1986): Wavelength selection in macular photocoagulation. *Tissue optics, thermal effects and laser systems*. *Ophthalmology*, 93: 952-958.
 221. MAINSTER M.A. (1989): Laser light, interactions and clinical systems. En: *Ophthalmic lasers* (F.A. L'Esperance, ed.): Cap.3: 61-77. C.V. Mosby, St. Louis. USA
 222. MANSON N., MARSHALL J., MELLEIRO J., SMART D (1972): Comments on histological studies of gas laser lesions in humans and possible non-linear optical phenomena, together with experiments using a tuneable dye-laser. *Modern Problems in Ophthalmol.* 10: 114-128
 223. MARCHESANI O. (1926): Die Morphologie der Glia im Nervous Opticus und in der retina, dargestellt nach den deuesten Untersuchungsmethoden und Untersuchungsergebnissen. *Grafe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 117: 575-605.

224. MARSHALL J., VOADEN M. (1974): An investigation of the cells incorporating (³H) GABA and (³H) Glycine in the isolated retina of the rat. *Exp. Eye. Res.*, 18: 367-370.
225. MARSHALL J., HAMILTON A.M., BIRD A.C. (1975): Histopathologic of ruby and argon laser lesions in monkey and human retina. *Brit. Journal Ophthal.*, 59: 610-630.
226. MARSHALL J. (1981): Interactions between sensory cells, glial cells and the retinal pigment epithelium and their response to photocoagulation. *Dev. Ophthalmol.*, 2: 308-317.
227. MARTÍN BARRERA F. (1989): La microglía de la retina. Tesis doctoral presentada en la Universidad Complutense de Madrid.
228. MATA M., ALESSI D., FINK D.J. (1990): S-100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. *Journal of Neurocitology*, 19: 732-442.
229. MAXWELL D.S., KRUGER L. (1965): Small blood vessels and the origin of the phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation. *Exper. Neurol.*, 12: 33-54.
230. McDONALD J.E., LIGHT A. (1957): Photocoagulation of iris and retina. *Arch. Ophthal.*, 60: 384-392.
231. McHUGH J.D.A., MARSHALL J., CAPON M., ROTHERY S., RAVEN A., NAYLOR R.P. (1988): Transpupillary retinal photocoagulation in the eyes of rabbit and human using a diode laser. *Lasers Light Ophthalmol* 2(2):125-143
232. McHUGH J.D.A., MARSHALL J., FFYTCH T.J., HAMILTON A.M., RAVEN A. (1990): Macular photocoagulation of human retina with a diode laser: a comparative histopathological study. *Laser Light Ophthalmol* 7(7): 11-28
233. McHUGH J.D.A., ENGLAND C., VAN DER ZYPEN E., MARSHALL J., FANKHAUSER F., FANKHAUSER-KWASNIEWSKA S. (1995): Irradiation of rabbit retina with diode and Nd:YAG lasers. *Br. J. Ophthalmol.* 79(7): 672-677
234. McMENAMIN P.G., CREWE J., MORRISON S., HOLT P.G. (1994): Immunomorphologic studies of macrophages and MHC Class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse and human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:3234-3250.
235. McNAUGHT E.I., FOULDS W.S., JOHNSON M.F. (1977): Effects of photocoagulation on the barrier function of the pigment epithelium. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.*, 97: 634-640.
236. McVICAR B.A., HOCHMAN D., DELAY M.J., WEISS S. (1991): Modulation of intracellular Ca⁺⁺ in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca⁺⁺ channels. *Glia*, 4: 448-455.
237. MENCHINI U., TRABUCCHI G., BRANCATO R., CAPPELLINI A. (1992): Can the diode laser (810nm) effectively produce chorioretinal adhesion? *Retina* 12(3):80-86
238. MESSMER E.P., FONT R.L. (1984): Application of immunochemistry to ophthalmic pathology. *Ophthalmology*, 91: 701-707.
239. MILLER B., MILLER H., PATTERSON R., RYAN S.J. (1986): Retinal wound healing. Cellular activity at the vitreoretinal interface. *Archives of Ophthalmol.*, 104: 281-285.
240. MOKUNO K., KAMHOLZ J., BEHRMAN T., BLACK C., SESSA N., FEINSTEIN D., LEE V., PLEASURE D. (1989): Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Journal of Neuroscience Res.*, 23: 396-405.
241. MOLNAR M.L., STEFANSSON K., MARTON L.S., TRIPATHI R.C., MOLNAR G.K. (1984): Distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Exp. Eye Res.*, 38: 27-34.
242. MOLNAR M.L., STEFANSSON K., MARTON L.S., TRIPATHI R.C., MARTON L.S. (1985): Species variations in distribution of S100 in retina. Demonstration with a monoclonal antibody and a polyclonal antiserum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 26: 283-288.
243. MORGAN J.E. (2000): Optic nerve head in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye*, 14, 437-444
244. MORI S., LEBLOND C.P. (1969): Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.*, 135: 57-80.
245. MORI S. (1972): Light and electron microscopic features of the glial cells present in the cerebral cortex of the rat brain. *Arch. Histol. Jap.*, 34: 231-244.
246. MORÓN-SALAS J. (1950): Obliteración de los desgarros retinianos por quemadura con luz. *Arch. Soc. Oftal. Hispano-Am.*, 10: 566-578.
247. MUCHNICK N., OBERDORFER (1981): Neuronal and neuroglial responses following retinal lesions in the neonatal rats. *Journal of Comparative Neurology*, 202: 493-504.
248. MURABE Y., SANO Y. (1981a): Thiaminepyrophosphatase activity in the plasma membrane of microglia. *Histochemistry*, 71: 45-52.
249. MURABE Y., SANO Y. (1981b): Possible involvement of microglial cells in synaptic function. *Neuroscience Lett. Suppl.*: S21.

250. MURABE Y., SANO Y. (1982a): Morphological studies on neuroglia v. microglial cells in the cerebral cortex of the rat, with special reference of their possible involvement in synaptic function. *Cell Tissue Res.*, 223: 493-506.
251. MURABE Y., SANO Y. (1982b): Morphological studies on neuroglia VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell Tissue Res.*, 225: 469-485.
252. MUSSER G.L., ROSEN S. (1973): Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate retina. *Exp. Eye. Res.*, 15: 105-119.
253. NAGELHUS E.A., VERUKI M.L., TORP R., HAUG F.M., LAAKE J.H., NIELSEN S., AGRE P., OTTERSEN O.P. (1998): Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci.*, 18: 2506-2519.
254. NAKANE P.K., PIERCE G.B. (1966): Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *Journal of Cell Biology*, 33:307.
255. NAKANE P.K. (1968): Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *Journal of Histoche. And Cytoche.*, 16: 557-560.
256. NEUFELD A.H. (1999): Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, 117, 8: 1050-1056.
257. NEWMAN E.A. (1984a): Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science*, 225: 1174-1175.
258. NEWMAN E.A. (1984b): Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature*, 309: 155-157.
259. NEWMAN E.A. (1985a): Regulation of potassium levels by glial cells in the retina. *Trends in Neuroscience*, 8: 156-159.
260. NEWMAN E.A. (1985b): Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*, 317: 809-811.
261. NEWMAN E.A. (1986a): High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science*, 233: 453-454.
262. NEWMAN E.A. (1986b): The Müller cell. En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, A. Vernadakis, Eds.), Vol I: Development, morphology and regional specialization of astrocytes, págs: 149-171. Academic Press INC., Orlando, USA.
263. NEWMAN E.A., ZAHS K.R. (1998): Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.*, 18: 4022-4028.
264. NEWMAN E.A. (1999): Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat. *Glia*, 26: 302-308.
265. NEWMAN E.A. (2001a): Glia of the retina. En: *Retina. Cap. VI., Vol. I* (Ogden T.E., Hinton D.R., eds.,) págs.: 89-103. Mosby, Inc., USA
266. NEWMAN E.A. (2001b): Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J. Neurosci.*, 21, 7: 2215-2223.
267. NIETO-SAMPEDRO M., SANETO P.R., DE VELLIS J., COTMAN C.W. (1985): The control of glial populations in brain: changes in astrocytes mitogenic and morphogenic factors in response to injury. *Brain Res.*, 343: 320-328.
268. NISHIKAWA S., TAMAI M. (2001): Müller cells in the human foveal region. *Current Eye res.*, 22: 34-41.
269. NOELL W.K., WALKER V.S., KANG B.S., BERMAN S. (1966): Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology*, 5, 5: 450-473.
270. NORENBORG M., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ A. (1979): Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 161: 303-310.
271. NORK T.M., WALLOW I.H.L., SRAMIEK S.J., ANDERSON G. (1987): Müller's cells involvement in proliferative diabetic retinopathy. *Arch. Ophthal.*, 105: 1424-1429.
272. NOYORI K S., CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., KOESTER C.J. (1963): Ocular theraml effects produced by photocoagulation. *Arch. Ophthal.*, 70: 817.
273. NOYORI K S., CAMPBELL C.J., RITTLER M.C., KOESTER C.J. (1964): The characteristics of experimental laser coagulations of the retina. *Arch. Ophthal.*, 72: 254-263.
274. OBANA A., LORENZ B., GAESSLER A., BIRNGRUBER R. (1992): The therapeutic range of chorioretinal photocoagulation with diode and argon lasers: an experimental comparison. *Lasers Light Optthalmol.* 4(3-4):147-156
275. OGDEN T.E., GREEN J.D., PETERSON R.G. (1974): Graded impregnation of nervous tissue stained by the Golgi procedure. *Stain Technology*, 49: 81-83.
276. OGDEN T.E. (1976): Nerve fiber layer of the primate retina: thickness and glial content. *Vis. Res.*, 23: 581-587.

277. OHIRA A., DE JUAN E. Jr. (1990): Characterization of glial involvement in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica*, 201: 187-195.
278. ONO K., YOKOTA S., TSUMORI T., KISHI T., YASUI Y. (1999): Development of macroglial cells in the embryonic chick optic nerve. *Develop. Brain Res.*, 118: 211-215.
279. ORKAND P.M., BRACHO H., ORKAND R.K. (1973): Glial metabolism: alteration by potassium levels comparable to those during neuronal activity. *Brain Res.*, 55: 467-471.
280. PATZ A. (1972): Further experimental and clinical observations with a burst argon laser. *Invest Ophthalmology*, 11: 70.
281. PAULSON O.B., NEWMAN E.A. (1987): Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*, 237: 896-898.
282. PENFIELD W. (1924): Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia. *Brain*, 47: 430-452.
283. PENFOLD P.L., PROVIS J.M. (1986): Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 224: 549-553.
284. PENFOLD P.L., PROVIS J.M., MADIGAN M.C., VAN DRIEL D., BILLSON F.A. (1990): Angiogenesis in normal human retinal development: the involvement of astrocytes and macrophages. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228: 255-263.
285. PENTREATH V.W., KAI-KAI M.A. (1982): Significance of the potassium signal from neurones to glial cells. *Nature*, 295: 59-61.
286. PERRY V.H., GORDON S. (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 11: 273-277.
287. PEYMAN G.A., BOK D. (1972): Peroxidase diffusion in the normal and laser photocoagulated primate retina. *Invest Ophthalmol.*, 11: 35-45.
288. PEYMAN G.A., KOZIOL J.E., SANDERS D.R., ULCHECK J.K. (1974a): Studies on intravitreal blood vessels. II:- Effectiveness of xenon arc and argon laser photocoagulation in blood vessel closure. *Invest Ophthalmol.*, 13: 441-454.
289. PEYMAN G.A., KOZIOL J.E., SANDERS D.R., ULCHECK J.K. (1974b): Studies on intravitreal blood vessels. III:- Effectiveness of intraocular diathermy on blood vessel closure; a comparison with argon laser. *Invest Ophthalmol.*, 13: 369-376.
290. PEYMAN G.A., GRISOLANO J.M., PALACIO M.N. (1980): Intraocular photocoagulation with the argon-krypton laser. *Arch. Ophthalmol.*, 98: 2062-2064.
291. PEYMAN G.A., CONWAY M.D., HOUSE B. (1983): Transpupillary CW YAG laser coagulation. A comparison with argon green and krypton red lasers. *Ophthalmology*, 90: 992-1002.
292. PEYMAN G.A., RAICHAND M., ZEIMER R.C. (1984): Ocular effects of various laser wavelengths. *Sur. Ophthalmol.*, 28: 391-404.
293. PIXLEY S.K.R., DE VELLIS J. (1984): Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Developmental Brain res.*, 15: 201-209.
294. POLYAK S.L. (1941): The retina. The anatomy and the histology of the retina in man, ape, and monkey, including the consideration of visual functions, the history of physiological optics, and the histological laboratory technique. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
295. POMERANTZEFF O., SCHEPENS C.L. (1975): Variation of energy density in argon laser photocoagulation. *Arch. Ophthalmol.*, 93: 1033-1035.
296. PORTER J.T., MCCARTHY K.D. (1997): Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in Neurobiology*, 51:439-455.
297. POWELL J.O., BRESNICK G.H., YANOFF M., FRISCH G.D., CHESTER J.E. (1971): Ocular effects of argon laser radiation. II.- Histopathology of chorioretinal lesions. *Am. J. Ophthalm.*, 71: 1267-1276.
298. POWELL J.O., TSO M.O.M., WALLOW I.H.L., FRISCH G.D. (1974): Recovery of the retina from argon laser radiation: clinical and light microscopic evaluation. *Ann. Ophthalm.*, 6, 10: 1003-1012.
299. PRIESTLEY J. (1987): Immunocytochemical techniques for the localization of neurochemically characterized nerve pathways. En: *Neurochemistry. A practical approach* (A.J. Turner, H.S. Bachelards, eds.); Págs: 65-112. IRL Press Limited. Oxford.
300. PROVIS J.M., PENFOLD P.L., MADIGAN M.C., VAN DRIEL D., BILLSON F.A. (1991): Angiogenesis in human retina development: astrocytes, macrophages and early lumen formation. En: *New frontiers in Ophthalmology* (C.Y. Khoo, B.C. Ang, W.M. Cheah, P.T.V. Chew, A.S.M. Lim, Eds.) Págs.: 608-612. Excerpta Medica. Amsterdam.
301. PROVIS J.M., SANDERCOE T., HENDRICKSON A.E. (2000): Astrocytes and blood vessels

- define the foveal rim during primate retinal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 2827-2836.
302. PULIAFITO C.A., DEUTSCH T.F., BOLL J., ENG M., TO K. (1987): Semiconductor laser endophotocoagulation of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 105:424-427
 303. PURO D-G., MANO T., CHAN C.C., FUKUDA M., SHIMIDA H. (1990): Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228: 169-173.
 304. PURO D.G. (1991): Strept-activated channels in human retinal Müller cells. *Glia*, 4: 456-460.(182TA)
 305. QUITSCHKE W., JONES P.S., SCHECHTER N. (1985): Survey of intermediate filament proteins in optic nerve and spinal cord: evidence for differential expression. *Journal of Neurochemistry*, 44: 1465-1476.
 306. RAIVICH G., BOHATSCHEK M., KLOSS C.U.A., WERNER A., JONES L., KREUTZBERG G.W. (1999): Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanism and cues to physiological function. *Brain Res.*, 30: 77-105
 307. RAKIC P. (1971): Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A golgi and electromicroscopic study in macacus rhesus. *J. Comp. Neurol.*, 141: 283-312.
 308. RAKIC P. (1981): Neuronal-glia interaction during brain development. *Trends in Neuroscience*, 4: 184-187.
 309. RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1989): Study of the choroidal innervation through immunocytochemical. En: *11nd International Symposium on the Choroid* (r.W. Flower, Eds.), Págs: 32-42. Maryland, USA.
 310. RAMÍREZ J.M., DE HOZ R., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., TRIVIÑO A., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1990): Fibras amielínicas coroideas. Estudio inmunohistoquímico. *Arch. Soc. Esp. Oftal.*, Invest, 3: 77-82.
 311. RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1994): Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.*, 34: 1934-1946.
 312. RAMÍREZ J.M., TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1996): Structural specializations of human retina glial cells. *Vision res.*, 36: 2029-2036.
 313. RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., ANDRÉS M.V., TRIVIÑO A. (1997): Morfología y distribución de los astrocitos del nervio óptico en el conejo albino. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, 72: 153-160.
 314. RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., DE HOZ R., TRIVIÑO A. (2001): Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.*, 73: 601-615.
 315. RAMÓN Y CAJAL S. (1889): *Manual de histología normal y técnica micrográfica*. Ed. Librería de Pascual Aguilar. Valencia.
 316. RAMÓN Y CAJAL S. (1892): La rétine des vertébrés. *La Cellule*, 9: 121-225.
 317. RAMÓN Y CAJAL S. (1899): Neuroglía. En: *Sistema Nervioso del Hombre y de los vertebrados*. Cap. VIII, págs: 176-195. Madrid
 318. RAMÓN Y CAJAL S. (1904): Sistema Visual: Órgano receptor de la excitación visual o retina. En: *Textura del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados*. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Tomo II (Primera parte), Cap. XIX; págs: 582-608. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid.
 319. RAMÓN Y CAJAL S., (1911): *Histologie du Système Nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol. 2, Chapitre XV: Appareil visuel, Rétine ou organe récepteur de l'excitation visuelle; págs: 298-367. Maloine. Paris.
 320. RAMÓN Y CAJAL S. (1913a): Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglía y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y los animales. *Trabajos de Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 11: 219-237.
 321. RAMÓN Y CAJAL S. (1913b): Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trabajos de Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid*, 11: 255-315.
 322. RAMÓN Y CAJAL S. (1920): Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Robertson y Río-Hortega. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*, 18: 109-127.
 323. RASSOW B., MOGHADAM R. (1972): Die laser-lichtkoagulation bei experimentell erzeugter amotio retinal an kaninchen. *Klinische Monat. Für Augenheil.*, 161: 52-55.
 324. REICHENBACH A. (1987): Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A

- light microscopical study on cells both in situ and isolated by papaine. *Journal für Hirnforschung*, 28: 213-220.
325. REID D.M., PERRY V.H., ANDERSON P.B., GORDON S. (1993): Mitosis and apoptosis of microglia in vivo induced by anti-cr3 antibody which crosses the blood brain barrier. *Neuroscience*, 56: 529-533.
 326. RHODES R.H. (1984): Ultrastructure of Müller cells in the developing human retina. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 221: 171-178.
 327. RICHTER W., REICHENBACH A., REICHEL T. (1990): Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cells and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *Journal of Neurocytology*, 19: 127-139.
 328. RIDET J.L., MALHOTRA S.K., PRIVAT A., GAGE F.H. (1997): Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, 20: 570-577.
 329. RIEPE R.E., NORENBURG M.D. (1977): Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature*, 268: 654-655.
 330. RIPPES H., WITKOVSKY P. (1985): Neuron-glia interaction in the brain and retina. *Progress in Retinal Research*, 4: 181-219.
 331. RISAU W., WOLBURG H. (1990): Development of the blood-brain barrier. *Trend in Neuroscience*, 13: 345-351.
 332. RITCHIE J.M. (1992): Voltage-gated ion channels in Schwann cells and glia. *Trend in Neuroscience*, 15: 345-351.
 333. ROBINSON S.R., DREHER Z. (1989): Evidence for three morphological classes of astrocyte in the adult rabbit retina: functional and developmental implications. *Neuroscience Letters*, 106: 261-268.
 334. ROBERTSON W.F. (1900): A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J. ment. Sci. (London)*, 46: 733-752.
 335. ROSAN R.C., FLOCKS M., VASSILIADIS A., ROSE H.W., PEABODY R.R., HAMMOND A. (1969): Pathology of monkey retina following irradiation with argon laser. *Arch. Ophthalmol.*, 81: 84-88.
 336. ROSE H.W. (1966): Factors determining ocular laser lesions. En: *Laser Photocoagulation*. Ed. IOC Vol. 6., N. 2: 253-262.
 337. ROWENS L., GLASSER B.M. (1985): Retinal pigment epithelial cells release a chemoattractant for astrocytes. *Archives of Ophthalmology*, 103: 704-707.
 338. SAKURAY Y., NISHIMURA D., YOSHIMURA K., TSURUO Y., SEIWA C., ASOU H. (1998): Differentiation of oligodendrocyte occurs in contact with astrocyte. *Journal of Neuroscience research*, 52: 17-26.
 339. SAMESHIMA M., UEHARA F., OHBA N. (1987): Specialization of the interphotoreceptor matrices around cone and rod photoreceptor cells in the monkey retina, as revealed by lectin cytochemistry. *Exp. Eye Res.*, 45: 845-863.
 340. SANDERCOE T.M., MADIGAN M.C., BILLSON F.A., PENFOLD P.L., PROVIS J.M. (1999): Astrocyte proliferation during development of the human retinal vasculature. *Exp. Eye res.*, 69: 511-523.
 341. SASSOE M., PANZANELLI P., ARTERO C., FASOLO A., CANTINO D. (1992): Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *European Journal of Histochemistry*, 36: 467-477.
 342. SATO K., YOSHIDA S., FUJIWARA K., TADA K., TOHYAMA M. (1991): Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Research*, 567: 64-70.
 343. SATO Y., BERKOWITZ B.A., WILSON C.A., DE JUAN E. (1992): Desestructuración de la barrera hematorretiniana secundaria a la fotocoagulación por láser de diodo versus láser de argón. *Arch. Ophthalmol.* 3(4):217-222
 344. SCHALOW A.L. (1966): Laser. En: *Laser Photocoagulation*. Ed. Milton Flocks IOC. Vol.6., n.2: 241-251.
 345. SCHERER J., SCHNITZER J. (1991): Intraorbital transection of the rabbit optic nerve: consequences for ganglion cells and neuroglia in the retina. *J. Comp. Neurol.*, 312: 175-192.
 346. SCHNITZER J. (1985): Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *Journal of Comparative Neurology*, 240: 128-142.
 347. SCHNITZER J., KARSCHIN A. (1986): The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Research*, 246: 91-102.
 348. SCHNITZER J. (1987a): Immunocytochemical localization of S-100 protein in astrocytes and Müller cells in the rabbit retina. *Cell Tissue Research*, 248: 55-61.
 349. SCHNITZER J. (1987b): Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the

- mammalian retina. *Neuroscience Letter*, 78: 29-34.
350. SCHNITZER J. (1988a): The development of astrocytes and blood vessels in the postnatal rabbit retina. *Journal of Neurocytology*, 17: 433-449.
 351. SCHNITZER J. (1988b): Astrocytes in mammalian retina. *Progress in Retinal Research*, 7: 209-231.
 352. SCHNITZER J. (1988c): Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Developmental Brain Research*, 44: 59-72.
 353. SCHNITZER J. (1988d): Astrocytes in the guinea pig, horse and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia*, 1: 74-89.
 354. SCHNITZER J. (1989): Enzyme histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neurol.*, 282: 249-263.
 355. SCHNITZER J., SCHERER J. (1990): Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neurol.*, 302: 779-791.
 356. SCHUTTE M., CHEN S., BUKU A., WOLOSIN J.M. (1998a): Connexin50, a gap junction protein of macroglia in the mammalian retina and visual pathways. *Exp. Eye res.*, 66: 605-613.
 357. SCHUTTE M., WERNER P. (1998b): Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosc. Lett.*, 246: 53-56.
 358. SETOGAWA T., FUJINAGA Y., MATSUURA H., MATSUTO T. (1973): Chorioretinal effects produced by experimental ruby laser on rabbit observations immediately and 6 months after irradiation. *Folia Ophthalmol. Jap.*, 24:1094-1100.
 359. SHAW G., WEBER K. (1984): The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species. *European Journal of Cell Biology*, 33: 95-104.
 360. SLINEY D.H.(1988): New chromophores for ophthalmic laser surgery. *Lasers Light Ophthalmol* 2(1):53-61
 361. SLINEY D.H., MARSHALL J. (1992): Tissue specific damage to the retinal pigment epithelium: mechanism and therapeutic implications. *Lasers Light Ophthalmol.* 5(1): 17-28
 362. SLINEY D.H. (1993): Choosing an optimum wavelength for diode laser photocoagulation. *Lasers Light Ophthalmol.* 6(1): 1-5
 363. SMIDDY W.E., FINE S.L., QUIGLEY H.A., DUNKELBERGER G., HOHMAN R.M., ADDICKS E.M. (1986): Cell proliferation after laser photocoagulation in primate retina. An autoradiographic study. *Arch. Ophthalmol.*, 104: 1065-1069.
 364. SMIDDY W.E., PATZ A., QUIGLEY H.A., DUNKELBERGER G.R. (1988): Histopathology of the effects of tuneable dye laser on monkey retina. *Ophthalmology.*, 95: 956-963.
 365. SMIDDY W.E., HERNÁNDEZ E. (1992a): Histopathologic results of retinal diode laser photocoagulation in rabbit eyes. *Arch. Ophthalmol.* 110(5):693-698
 366. SMIDDY W.E., HERNÁNDEZ E. (1992b): Histopathologic characteristics of diode laser-induced chorioretinal adhesions for experimental retinal detachment in rabbit eyes. *Arch. Ophthalmol.* 110(11):1630-1633
 367. SMITH R.S., STEIN M.N. (1968): Ocular hazards of transcleral laser radiation. I.- Spectral reflection and transmission of the sclera, choroid and retina. *Am. J. Ophthalmol.*, 66, 1: 21-31.
 368. SOBRADO-CALVO P., VIDAL-SANZ M., VILLEGAS-PÉREZ M.P. (2007): Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors on macrophage inhibitory factor. *J. of Comparative Neurology.*, 501:866-878
 369. SOKOLOVSKY V.V., USHKOVA I.N., BEREZIN I.D., POKROVSKAIA L.A., RODIONOVA L.P., GONCHAROVA L.L., MALYKOVA N.I.U., MAKAROVA I.N. (1990): The stimulating effect of helium-neon laser radiation on rabbit eyes. *Ophthalmol. Zh.*, 3: 176-178.
 370. SOLE P., DALENS H., GENTOU C. (1992): *Biophthalmologie. Libro VI: Le Système Nerveux. Chapitre I: Généralités sur le système nerveux*; págs: 3-72. Masson. Paris.
 371. SOLON L.R., ARONSON R., GOULD G. (1961): Physiological implications of laser beams. *Science*, 134: 1506-1508.
 372. SONNEWALD U., WESTERGAARD N., SCHOUSBOE A. (1997): Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*, 21: 56-63
 373. STENSAAS L.J., STENSAAS S.S. (1968): Astrocytic neuroglial cells, oligodendrocytes and microglial cells in the spinal cord of the toad II. Electron microscopy. *Z. Zellforsch.*, 86: 184-213.
 374. STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS J.J., MEYER H.G. (1970): The unlabeled

- antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18: 315-333.
375. STEWART P.A., WILEY M.J. (1981): Developing nervous tissue formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Developmental Biology*, 84: 183-192.
 376. STEWART P.A., COOMBER B.L. (1986): Astrocytes and the blood-brain barrier. En: *Astrocytes* (S. Fedoroff, a. Vernadakis, Eds.); Vol. I: Development, morphology and regional specialization of astrocytes; págs: 311-328. Academic Press INC, London.
 377. STONE J., DREHER Z. (1987): Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *Journal of Comparative Neurology*, 255: 35-49.
 378. STREIT W.J., KREUTZBERG G.W. (1987): Lectin binding by resting and reactive microglia. *Journal of Neurocytology*, 16:249-260.
 379. STREIT W.J., GRAEBER M.B., KREUTZBERG G.W. (1989): Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol.*, 105: 115-126.
 380. STREIT W.J. (1990): An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA-IB4). *J. Histochem. Cytochem.*, 38: 1683-1686.
 381. STREIT W.J. (2000): Microglial response to Brain Injury. *Toxicologic Pathology*, 28, 1:28-30
 382. STREIT W.J. (2002): Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139
 383. SUZAMURA A., MARUNOUCHI T., YAMAMOTO H. (1991): Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.*, 545: 301-306.
 384. SWARTZ M. (1986): Histology of macular photocoagulation. *Ophthalmology*, 93: 959-963
 385. TALEFF M., RITTER E.J., ROCKWELL R.J., STOSPEICH B.C. (1969): Laser coagulation of the retina using the argon laser. *Am. J. Ophthal.*, 67: 666-670.
 386. TARRÉS M.A.G., GALLEGÓ A. (1986): Microglía y células horizontales de la retina de los mamíferos. *Arch. Soc. Esp. Oftal.*, 50: 327-336.
 387. TASSIGNON M.J., STEMPELS N., NGUYEN-LEGROS J., SE WILDE F., BRIHAYE M. (1991): The effect of the wavelength on glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in laser induced lesions in rabbit retina. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 229: 380-388.
 388. TERENGI G., COCCHIA D., MICHETTI P., DIANI A.R., PETERSON T., COLE D.F., BLOOM S.R., POLYAK J.M (1983): Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina. I.- Light microscopical immunocytochemistry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Science*, 24: 976-980.
 389. TERUBAYASHI H., MURABE J., FUJISAWA H., ITOI M., IBATA J. (1984): Enzymohistochemical identification of microglial cells in the rat retina: Light and electron microscopic studies. *Exp. Eye Res.*, 39: 595-603.
 390. THANOS S., THIEL H-J. (1990): Regenerative and proliferative capacity of adult human retinal cells in vitro. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228: 369-376.
 391. THANOS S., PAULIDIS C., MAY J., THIEL H.J. (1992): Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.*, 55: 101-117.
 392. THOMAS E.L., APPLE D.J., SWARTZ M., NORMAN D.K. (1984): Histopathology and ultrastructure of krypton and argon lesions in a human retina-choroid. *Retina* 4: 22-39
 393. THOMAS W.E. (1992): Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Reviews*, 17: 61-74.
 394. TOLIVIA D. (1975): Un nuevo método sencillo y constante para la impregnación argéntica de la glia astrocitaria y una variante del mismo aplicable a la rápida y segura demostración de fibras reticulares. *Trabajos del Instituto Cajal de Investigaciones Biológicas*, 67: 247-258.
 395. TRACHTENBERG M.C., POLLEN D.A. (1970): Neuroglia: biophysical properties and physiologic function. *Science*, 167: 1248-1252.
 396. TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., RIVERA M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1988): Estudio de las relaciones vaso-gliales en la retina del conejo albino (*Oryctolagus cuniculus*). *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest.*, 1: 103-110.
 397. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M. (1989): Anatomofisiología de la coroides. En: *La Circulación Coroidea* (F. Gómez-Ulla, F. Marín, J.M. Ramírez, A. Triviño, Eds.).Cap.1, págs: 7-29. Edika Med. S.A., Barcelona.
 398. TRIVIÑO A., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., RAMÍREZ J.M., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1990): Astrocytes retinianos relacionados con los axones de las células ganglionares. Estudio inmunohistoquímico. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, Invest.*, 3: 87-92.

399. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1991): Estudio mediante el método de diafanización de la vascularización retiniana del conejo. *St. Ophthal. X* (3): 13-18
400. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1992): Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Research*, 32: 1601-1607.
401. TRIVIÑO A., ANDRÉS M.V., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., RAMÍREZ J.M., GÓMEZ-ULLA F. (1995a): Estudio experimental de las alteraciones corio-retinianas en conejos pigmentados tras la aplicación del láser teñido. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol* 68: 389-398.
402. TRIVIÑO A., ANDRÉS M.V., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GÓMEZ-ULLA F., GÓMEZ-TORRIJOS I (1995b): Alteraciones coriorretinianas en conejos pigmentados tras la aplicación del láser de diodo. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol* 69: 319-326.
403. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1996): Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision res.*, 36, 14: 2015-2028.
404. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J., ANDRÉS MV., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1997a): Comparison between chorioretinal effects of the single-pulse versus micropulsed diode laser in pigmented rabbits. *Lasers Lisgt Ophthalmol.* 8(1):31-38
405. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., RAMÍREZ A.I., SALAZAR J.J., GARCÍA-SÁNCHEZ J. (1997b): Comparative study of astrocytes in human and rabbit retina. *Vision Res.*, 37: 1607-1611
406. TRIVIÑO A., RAMÍREZ J.M., SALAZAR J.J., RAMÍREZ A.I. (2000): Human retinal astroglia. A comparative study of adult and the 18 month postnatal development stage. *J. Anat.*, 196, 61-70
407. TSO M.O.M., WALLOW I.H.L., POWEL J.O. (1973): Differential susceptibility of rod and cone cells to argon laser. *Arch. Ophtalmol.*, 89: 228-234.
408. TSO M.O.M., WALLOW I.H.L., ELGIN S. (1977): Experimental photocoagulation of the human retina. I., Correlations of physical, clinical and pathologic data. *Arch. Ophtalmol.*, 95: 1035-1040.
409. TSO M-O-M-. WOODFORD B.J. (1983): Effect of photic injury on the retinal tissues. *Ophtalmology.*, 9, 8: 952-963.
410. TUCCARI G., TROMBETTA C., GIARDINELLI M.M., ARENA F., BARRESI G. (1986): Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Basic and Applied Histochemistry*, 30: 425-432.
411. UYEDA C.T., ENG L.F., BIGNAMI A. (1972): Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Research*, 37: 81-89.
412. VACA K., WENDTE . (1992): Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival. *Experimental Neurology*, 118: 62-72.¿?
413. VAN DER ZYPEN E., FANKHAUSER F., RAESS K., ENGLAND C. (1986): Morphologic findings in the rabbit retina following irradiation with the free-running Neodymium-Yag laser. *Arch. Ophthalmol* 104: 1070-1077
414. VAN DER ZYPEN E., FANKHAUSER F., KWASNIEWSKA S., ENGLAND C. (1990): Transpupillary irradiation of the rabbit retina with the CW-Nd:YAG laser I:-Acute morphologic effects produced using two different pulse forms. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31, 1: 29-40.
415. VAN HORN D.L., AEGERG T.M., MACHEMER R. (1977): Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *American Journal of Ophthalmology*, 84: 383-393.
416. VAQUERO J., COCA S. (1987): Diagnóstico inmunopatológico de los tumores cerebrales. *Tiempos Médicos*, Anuario 1987: 118-123.
417. VELA J.M., DALMAU I., GONZÁLEZ B., CASTELLANO B. (1995): Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, 361: 602-616
418. VELA J.M., DALMAU I., GONZÁLEZ B., CASTELLANO B. (1996): The microglial reaction in spinal cords of jimpy mice is related to apoptotic oligodendrocytes. *Brain Res.*, 712: 134-142.
419. VERHOEFF F.H., BELL L. (1916): The pathological effects of radiant energy on the eye. *Proc. Amer. Acad. Arts. Sci.* 51: 629.
420. VIBULSRETH S., HEFTI F., GINSBERG MD.D., DIETRICH W.D., BUSTO R. (1987): Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia. *Brain Research*, 422: 303-311.
421. VILLEGAS G.M. (1964): Ultrastructure of the human retina. *Journal of Anatomy*, 98: 501-513.
422. VOGEL A., BIRNGRUBER R. (1992): Temperature profiles in human retina and choroids during laser coagulation with different wavelengths ranging from 510 to 810nm. *Lasers Light Ophtalmol.*5:9-16

423. VRABEC F. (1968): La microglie de la rétine, des voies optiques du corp genouille lateral, de l'aire striée, ainsi que du toit optique du macaque. Arch. Opht. (Paris), 28, 4: 417-426.
424. VRABEC F. (1969): Les éléments cellulaires su corps vitré. Ann. d'Ocul. (Paris), 202: 561-572.
425. VRABEC F. (1970): Microglia in the monkey and rabbit retina. J. Neuropathol., 29: 217-224.
426. VRABEC F. (1975): Activated human retinal microglia under pathological conditions. Albrecht V. Graefes Arch. Kli. Exp. Ophthal., 196: 49-60.
427. WALLOW I.H.L., TSO M.O.M., FINE B.S. (1973a): Retinal repair after experimental Xenon arc photocoagulation. 1.- A comparison between Rhesus monkey and rabbit. Am. J. Ophthalmol. 75: 35-52
428. WALLOW I.H.L., TSO M.O.M. (1973b): Retinal repair after experimental Xenon arc photocoagulation. 2.- A clinical and light microscopic study of the evolution of retinal lesions in the Rhesus monkey. Am. J. Ophthalmol. 75: 610-626
429. WALLOW I.H.L., TSO M.O.M. (1973c): Retinal repair after experimental Xenon arc photocoagulation. 3.- An electron microscopic study of the evolution of the retinal lesions in the Rhesus monkey. Am. J. Ophthalmol. 75: 957-972
430. WALLOW I.H.L., TSO M.O.M., ELGIN S. (1977): Experimental photocoagulation of the human retina. II.- Electron microscopic study. Arch. Ophthalmol., 95: 1041-1050.
431. WALLOW I.H., SPONSEL W.E., STEVENS T.S. (1991): Clinicopathologic correlation of diode laser burns in monkeys. Arch. Ophthalmol. 109(5):648-653
432. WATSON W.E. (1974): Physiology of neuroglia. Physiol. Revs., 54: 245-271.
433. WEALE R.A. (1962): An early stage in the pathology of photocoagulation. Am. J. Ophthalmol., 53: 665.
434. WEIDMAN T.A. (1973): The retina. En: Ocular fine structure for the clinician (K.M. Zinn, Ed.). International Ophthalmology Clinics, Vol. 13: 205-227. Little, Brown and Company. Boston.
435. WENDELL-SMITH C.P., BLUNT M.J. (1965): Possible role of neuroglia. Nature, 208: 600-601.
436. WENDELL-SMITH C.P., BLUNT M.J., BALDWIN F. (1966): The ultrastuctural characterization of macroglial cell types. Journal of Comparative Neurology, 127: 219-240.
437. WEST R.W. (1978): Bipolar and horizontal cells of the gray squirrel retina: Golgi morphology and receptor connections. Vision Res., 18: 129-136.
438. WIESINGER H. et col. (1956): The transmission of light through the ocular media of the rabbit eye. Amer. J. Ophthal., 42: 907-910.
439. WIESINGER H., HAMPRECHT B., DRINGEN R. (1997): Metabolic pathways for glucose in astrocytes. Glia 21: 22-34
440. WOLBURG H., WILLBOLD E., LAYER P.G. (1991): Müller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly in vitro only in the presence of marginal pigmented epithelium. Cell Tissue Res., 264: 437-451.
441. WOLBURG H., LIEBNER S., REICHENBACH A., GERHARDT H. (1999): The pecten oculi of the chicken: A model system for vascular differentiation and barrier maturation. Int. Rev. Cytology, 187, 111-159.
442. WOLFF E. (1968): The retinal neuroglia. En: Anatomy of the eye and orbit (Including the central connections, development, and comparative anatomy of the visual apparatus). Sixth Edition. (Revised by R.J. Last); págs.: 135-138. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
443. WOLFF J.R. (1970): El astrocito, elemento de enlace entre el capilar y la célula nerviosa. Triángulo, 9: 153-164.
444. WOLTER J.R. (1955a): The astroglia of the human retina: and other glial elements of the retina under normal and pathologic conditions. American Journal of Ohthalmology, 40: 88-100.
445. WOLTER J.R. (1955b): The cells of Remark and the astroglia of the normal human retina. American Journal of Ohthalmology, 53: 832-838.
446. WOLTER J.R. (1956a): Perivascular glia of the blood vessels of the human retina. American Journal of Ophthalmology, 44: 766-773.
447. WOLTER J.R. (1956b): Reactions of the elements of retina and optic nerve. In common morbid entities of the human eye. American Journal of Ophthalmology, 42 (pt. II): 10-27.
448. WOLTER J.R. (1959): Glia of the human retina. American Jouranal of Ophthalmology, 48 (pt. II): 370-393.
449. WOLTER J.R. (1960): The macrophages of the human vitreous body. Amer. J. Ophthal., 49: 99-107.
450. WOLTER J.R. (1961): Silver carbonate techniques for the demonstration of ocular histology.

- En: The structure of the eye (G.K. Smelser, Ed.): 117-138. Academic Press. New York.
451. WOLTER J.R., GOLDSMITH R.L., PHILIPPS R.L. (1957): Histopathology of the star figure of the macular area in diabetic and angiosplastic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 57: 376-785.
 452. WOLTER J.R., PHILLIPS R.L., BUTLER R.G. (1958): The star figure of the macular area. *Arch. Ophthalmol.*, 60: 49-59.
 453. WOOD L.W., WATZKE R.C. (1969): The effects of photo- and laser coagulation on the retinal vasculature. *Arch. Ophthalmol.*, 82: 499-505.
 454. YAMADA T., KUWAMATA T., WALKER D.G., McGEER P.L. (1992): Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathologica*, 84: 157-162.
 455. YAMASAKI E.N., KRUPNIK V.E., CHUN L.L.Y. (1998): Developmental study of Müller cells in the rat retina using a new monoclonal antibody, RT10F7. *Neuroscience*, 85, 2: 627-636.
 456. YAO X.Y., HAGEMAN G.S., MARMOR M.F. (1990): Retinal adhesiveness is weakened by enzymatic modification of the interphotoreceptor matrix in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 31: 2051-2058.
 457. YAO J., KERI J.E., TAFFS R.E., COLTON C.A. (1992): Characterization of interleukin-1 production by microglia in culture. *Brain res.*, 591: 88-93.
 458. YEN S.H., FIELDS K.L. (1981): Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament protein bind to different cell types of nervous system. *Journal of Cell Biology*, 88: 115-126.
 459. ZARET M.M., BREININ G.M., SCHMIDT H., RIPPS H., SIEGEL I.M., SOLON L.R. (1961): Ocular lesions produced by an optical maser (laser). *Science* 134: 1525.
 460. ZARET M.M. et col. (1963): Laser coagulation of the eye. *Arch. Ophthalmol.*, 69: 97-104.
 461. ZHANG J., WU G.S., ISHIMOTO S.I., PARARAJASEGARAM G., RAO N.A. (1997): Expression of major histocompatibility complex molecules in adult retina: immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38, 9: 1848-1857.
 462. ZHANG Y., PORAT R.M., ALON T., KESHET E., STONE J. (1999): Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Develop. Brain Res.*, 118: 135-145.
 463. ZUCLICH J.A., ELLIOTT W.R., COFFEY D.J. (1992): Suprathreshold retinal lesions induced by laser radiation. *Lasers Light Ophthalmol.* 5:51-59
 464. ZWENG H.C., FLOCKS M., KANAPY N.S., SILBERTRUST N., PEPERS N.A. (1964): Experimental laser photocoagulation. *Am. J. Ophthalmol.*, 58, 3: 353-362.
 465. ZWENG H.C., FLOCKS M., PEABODY R. (1966): Histology of human ocular laser coagulation. *Arch. Ophthalmol.*, 76: 11-15.